Saggio MiSeqDx™ Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

N. di catalogo DX-102-1001: 6 corse, fino a 48 campioni per kit

Uso previsto

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina è un sistema diagnostico *in vitro* per il sequenziamento mirato che risequenzia le regioni di codifica delle proteine e i limiti introne/esone del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (*CFTR*) in DNA genomico isolato da campioni di sangue intero periferico umano raccolto in K_2EDTA. Il test rileva le varianti di singolo nucleotide e Indel piccoli nella regione sequenziata e inoltre referta su due mutazioni introniche profonde e due delezioni ampie. Il test deve essere usato sullo strumento Illumina MiSeqDx.

Questo test è previsto per contribuire alla diagnosi in individui con sospetta fibrosi cistica (CF). Questo saggio è più appropriato quando il paziente presenta una fibrosi cistica atipica o non classica o quando altri pannelli di mutazioni non sono riusciti a identificare entrambe le mutazioni causanti la malattia. I risultati del test devono essere interpretati da un gruppo di genetisti molecolari certificati o da un esperto equivalente e devono essere usati assieme ad altre informazioni inclusi sintomi clinici, altri test diagnostici e anamnesi familiare.

Questo test non è indicato per indipendente diagnosi neonatale, diagnosi prenatale, analisi pre-impianto, screening del portatore, screening dei neonati o screening della popolazione.

Riassunto e spiegazione del saggio

Descrizione clinica

La fibrosi cistica (CF) è una delle malattie genetiche più comuni nel mondo occidentale ed è la malattia autosomica recessiva potenzialmente letale più comune nella popolazione bianca non ispanica[1-5]. La fibrosi cistica incide sulla viscosità delle secrezioni mucose e influenza l'epitelio del tratto respiratorio, del pancreas, dell'intestino, del sistema epatobiliare, del tratto genitale maschile nonché le ghiandole sudoripare causando una complessa patologia multisistemica e multiorgano[2-4] nella quale i polmoni sono il sistema d'organi principalmente associato a morbilità e mortalità[6]. In molti casi, un declino nutrizionale preannuncia una progressione della malattia polmonare dovuta alla fibrosi cistica; pertanto, un elemento fondamentale delle attuali strategie di intervento è la diagnosi precoce tramite screening neonatale[5], che favorisce un accesso tempestivo ai servizi medici fondamentali e consente di ottenere il miglior risultato possibile per gli individui affetti dalla patologia[2,5]. Benché vi siano differenze tra i sessi per quanto riguarda la sopravvivenza e venga riferita una sopravvivenza mediana superiore per gli uomini rispetto alle donne, negli Stati Uniti la sopravvivenza mediana generale è di 38,3 anni[6].

Varianti del gene *CFTR* e incidenza

Il gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (*CFTR*) identificato nel 1989 si trova sul braccio lungo del cromosoma 7 e contiene 27 esoni codificanti distribuiti su oltre 230 kb[2]. Un mRNA di 6,5 kb prodotto dall'allele normale codifica il gene CFTR, una proteina integrale di 1.490 aminoacidi situata sulla membrana che funziona come canale di cloro regolato nelle cellule epiteliali di più organi[2,3]. Attualmente sono state descritte oltre 1.900 varianti del gene *CFTR*. Per la maggior parte si tratta di mutazioni puntiformi[7]. La variante del gene *CFTR* più comune è l'allele F508del[3], che rappresenta quasi il 70% di tutte le varianti del gene *CFTR*[1]. Tuttavia altre varianti comuni del gene *CFTR* spesso determinano un fenotipo CF e altre patologie correlate a CFTR[1-3].

La fibrosi cistica ha un'incidenza di malattia stimata pari a un caso ogni 2.000-4.000 nati vivi e una prevalenza di circa 30.000 individui nella popolazione statunitense[2]. Si verifica in tutte le etnie e razze con frequenze diverse: un caso ogni 3.000 caucasici, un caso ogni 9.200 ispano-americani, un caso ogni 10.900 nativi americani, un caso ogni 15.000 afroamericani, e un caso ogni 31.000 asioamericani[2,4]. Tuttavia, l'associazione tra un'etnia e un individuo interessato sta diventando sempre più difficile[8]. La Tabella 1 fornisce le stime attuali della frequenza dei portatori della mutazione del gene CFTR in base all'etnia negli Stati Uniti, basate su una coorte di 364.890 individui testati per il portatore senza anamnesi familiare di fibrosi cistica.

Tabella 1 Frequenza generale del portatore della mutazione della fibrosi cistica in diversi gruppi etnici negli Stati Uniti[9]

Gruppo etnico	Frequenza del portatore osservata
Afroamericano	1 su 84
Ebrei aschenaziti	1 su 29
Asiatico	1 su 242
Caucasico	1 su 28
Ispanico	1 su 59
Ebreo	1 su 32
Medio orientale	1 su 91
Nativo americano	1 su 70
Sudasiatico	1 su 118
Altra etnia	1 su 111
> 1 etnicità	1 su 34
Parte afroamericano	1 su 56
Parte caucasico	1 su 32
Parte ispanico	1 su 51
Non fornito	1 su 37
Tutti gli individui	1 su 38

Progettazione del saggio

Tutte le regioni di codifica delle proteine nel gene *CFTR* inclusi 10 nt di sequenza intronica fiancheggiante sono rilevati per tutti gli esoni fatta eccezione di tre (esone 7, 10 e 20). Per l'esone 7 e l'esone 10, solo 5 nt di sequenza intronica fiancheggiante sono inclusi all'estremità 5' dell'esone per evitare Indel omopolimerici prossimali. Per l'esone 20, 30 nt di sequenza intronica fiancheggiante sono inclusi all'estremità 5' dell'esone in grado di rilevare la mutazione 3272-26A>G. Inoltre il saggio rileva circa 100 nt di sequenza intronica fiancheggiante le regioni non tradotte (UTR) 5' e 3', 2 profonde mutazioni introniche (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T), 2 ampie delezioni (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23) e la regione PolyTG/PolyT. La copertura completa del saggio è mostrata nelle posizioni delle coordinate genomiche elencate nella Tabella 2.

Tabella 2 Copertura delle coordinate genomiche per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

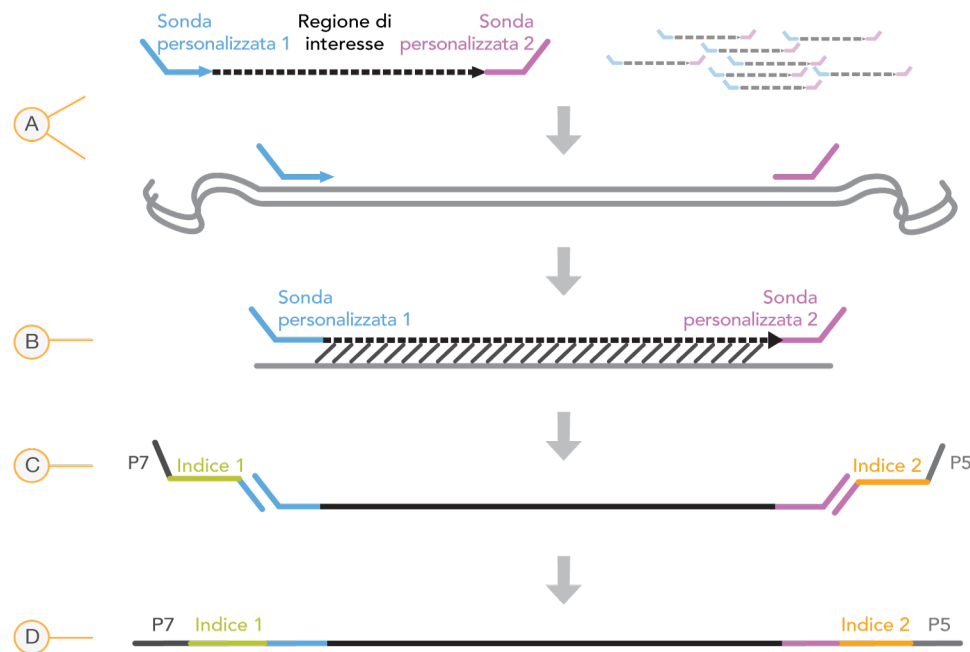
	Avvio della coordinata genomica hg19 (cromosoma 7)	Arresto della coordinata genomica hg19 (cromosoma 7)	Lunghezza (coppia di basi)
CFTR_Exon 1	117120041	117120211	171
CFTR_Exon 2	117144297	117144427	131
CFTR_Exon 3	117149078	117149206	129
CFTR_Exon 4	117170943	117171178	236

	Avvio della coordinata genomica hg19 (cromosoma 7)	Arresto della coordinata genomica hg19 (cromosoma 7)	Lunghezza (coppia di basi)
CFTR_Exon 5	117174320	117174429	110
CFTR_Exon 6	117175292	117175475	184
CFTR_Exon 7^	117176597	117176737	141
CFTR_Exon 8	117180144	117180410	267
CFTR_Exon 9	117182060	117182172	113
CFTR_Exon 10^	117188690	117188887	198
CFTR_Exon 11	117199508	117199719	212
CFTR_Exon 12	117227783	117227897	115
CFTR_Intron 12*	117229516	117229526	11
CFTR_Exon 13	117230397	117230503	107
CFTR_Exon 14	117231978	117232721	744
CFTR_Exon 15	117234974	117235122	149
CFTR_Exon 16	117242870	117242927	58
CFTR_Exon 17	117243576	117243846	271
CFTR_Exon 18	117246718	117246817	100
CFTR_Exon 19	117250563	117250733	171
CFTR_Exon 20#	117251605	117251872	268
CFTR_Exon 21	117254657	117254777	121
CFTR_Exon 22	117267566	117267834	269
CFTR_Intron 22*	117280010	117280020	11
CFTR_Exon 23	117282482	117282657	176
CFTR_Exon 24	117292886	117292995	110
CFTR_Exon 25	117304732	117304924	193
CFTR_Exon 26	117305503	117305628	126
CFTR_Exon 27	117306952	117307262	311
Basi totali			5203**

^ Per l'esone 7 e l'esone 10, solo 5 nt di sequenza intronica fiancheggiante sono inclusi a valle per l'esone. Questo per evitare stretch omopolimerici in queste regioni. Nel caso dell'esone 10, questa è la regione PolyT/PolyTG nell'introne 9. Questa regione viene trattata in modo particolare e separatamente.
* Per le mutazioni introniche profonde, sono inclusi anche 5 nucleotidi che fiancheggiano le varianti SNV su entrambi i lati.
# Per l'esone 20, 30 nt di sequenza intronica fiancheggiate sono inclusi all'estremità 5' dell'esone per permettere il rilevamento della mutazione 3272-26A>G.
** Con le due ampie delezioni e le regioni PolyTG/PolyT, il numero totale di posizioni/regioni è 5.206.

Principi della procedura

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina comporta due procedure principali. La prima consiste nel preparare manualmente i campioni per il sequenziamento, un'operazione detta preparazione della libreria. La preparazione della libreria consiste di quattro fasi principali: ibridazione, estensione-ligazione, amplificazione mediante PCR e normalizzazione della libreria. La seconda procedura consiste nel sequenziare il campione preparato mediante la chimica SBS (sequenziamento mediante sintesi) su MiSeqDx.

Preparazione della libreria

- **A Ibridazione**: la prima fase consiste nell'ibridare un pool di oligonucleotidi a monte e a valle specifici per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing per il campione di DNA genomico. Al termine di questo processo, una procedura di lavaggio in tre fasi, con un filtro in grado di selezionare le dimensioni, rimuove gli oligonucleotidi non legati dal DNA genomico.
- **B Estensione-ligazione**: la seconda fase collega gli oligonucleotidi a monte e a valle ibridati. Una DNA polimerasi si estende dagli oligonucleotidi a monte fino alla regione target e successivamente si lega all'estremità 5' dell'oligonucleotide a valle mediante una DNA ligasi. Il risultato consiste nella formazione di prodotti contenenti gli oligonucleotidi della fibrosi cistica specifici affiancati da sequenze necessarie per l'amplificazione.
- **C Amplificazione mediante PCR**: la terza fase consiste nell'amplificazione dei prodotti dell'estensione-ligazione mediante primer che aggiungono sequenze di indici per il multiplex campioni, oltre a comuni adattatori necessari per la generazione dei cluster su MiSeqDx. Al termine di questo processo, una procedura di pulizia della PCR purifica i prodotti della PCR (indicati come libreria).

D **Normalizzazione della libreria**: la fase finale consiste nel normalizzare la quantità di ciascuna libreria onde garantire una rappresentazione più equilibrata nel pool finale di librerie. Al termine di questo processo, il pool di librerie viene caricato su MiSeqDx per il sequenziamento mediante la chimica SBS.

Sequenziamento

La chimica SBS utilizza un metodo che fa uso di terminatori reversibili per rilevare le singole basi nucleotidiche man mano che vengono incorporate in filamenti di DNA crescenti. Durante ciascun ciclo di sequenziamento, alla catena dell'acido nucleico viene aggiunto un solo deossinucleotide trifosfato (dNTP) marcato in fluorescenza. Il nucleotide marcato funge da terminatore per la polimerizzazione, così dopo ogni incorporazione di dNTP, il colorante fluorescente viene sottoposto a imaging al fine di identificare la base e quindi sottoposto a scissione enzimatica per consentire l'incorporazione del nucleotide successivo. Poiché tutti e quattro i dNTP legati al terminatore reversibile (A, G, T, C) sono presenti come molecole singole e separate, la competizione naturale riduce al minimo le distorsioni dovute all'incorporazione. Le identificazioni delle basi vengono effettuate direttamente dalle misurazioni dell'intensità del segnale durante ogni ciclo di sequenziamento. Il risultato finale è un sequenziamento base per base.

Analisi dei dati

MiSeq Reporter elabora le identificazioni delle basi generate durante l'analisi primaria e produce informazioni su ciascun campione in base alle informazioni specificate nel foglio campioni, questa elaborazione si chiama analisi secondaria. L'analisi secondaria include de-multiplex, generazione di file FASTQ, allineamento, identificazione delle varianti e generazioni di file VCF che contengono le informazioni relative alle varianti del gene CFTR individuate in posizioni specifiche in un genoma di riferimento.

- **De-multiplex**: il de-multiplex costituisce la prima fase dell'analisi se nel foglio campioni sono elencati più campioni e la corsa presenta letture indici. Il de-multiplex separa i dati da un pool di campioni in base agli indici sequenza univoci che sono stati aggiunti durante la fase di amplificazione mediante PCR.
- **Generazione di file FASTQ**: dopo il de-multiplex, MiSeq Reporter genera file intermedi in formato FASTQ, un formato di testo utilizzato per rappresentare le sequenze. I file FASTQ contengono le letture di ciascun campione e i punteggi qualitativi, con l'esclusione delle letture dei cluster che non hanno attraversato il filtro.
- **Allineamento**: mediante l'allineamento è possibile confrontare le sequenze rispetto a un riferimento al fine di identificare una relazione fra le sequenze e assegnare un punteggio in base a regioni di similarità. Le letture allineate sono scritte nei file in formato BAM. MiSeq Reporter utilizza un algoritmo di Smith-Waterman con matrice a banda che esegue allineamenti locali di sequenze per determinare il grado di similarità fra due sequenze.
- **Identificazioni delle varianti**: durante questa fase vengono registrate le varianti di singolo nucleotide (SNV), le inserzioni e delezioni (Indel) e altre varianti strutturali in un file di testo libero (parsable) e standardizzato chiamato MiSeqDxCFClinicalSequencingAssay.txt. Per maggiori informazioni, vedere la sezione File report dell'analisi nella *Guida per l'utente di MiSeq Reporter (n. codice 15038356_ITA).*

Limiti della procedura

1. Il saggio sequenzia le regioni seguenti nel gene CFTR:
   a. Tutte le regioni di codifica delle proteine nel gene CFTR su 27 esoni
   b. Tra 5 e 10 basi di sequenze introniche fiancheggianti
   c. Cento nucleotidi di sequenza intronica alle regioni 5′ e 3′ non tradotte
   d. Due mutazioni introniche profonde (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T)
   e. La sequenza PolyTG/PolyT si trova nell'introne 9
   f. Un totale di 5.206 posizioni/regioni delle possibili 188.702 coppie di basi nel gene.
2. Per uso diagnostico *in vitro*. I risultati ottenuti usando il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina dovrebbero essere usati e interpretati nel contesto di una valutazione clinica completa.
3. Il saggio è progettato per sequenziare le regioni di codifica delle proteine e i confini introne/esone del gene CFTR e non comprende tutte le regioni introniche e le delezioni ampie. Pertanto, un risultato complessivo

"wild type" non garantisce che nei campioni analizzati non siano presenti altre varianti/mutazioni del regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (*CFTR*).

— Il saggio è progettato per rilevare due delezioni ampie specifiche: CFTRdele2,3 e CFTRdele22,23. Non saranno rilevate o segnalate altre delezioni ampie. Il saggio è convalidato solo per inserzioni e le delezioni fino a e includendo 3bp in dimensione.

4 La frequenza delle varianti identificate mediante questo saggio varia fra le diverse popolazioni. Con questo saggio non è possibile convalidare tutte le combinazioni delle varianti che possono essere rilevate nel gene *CFTR*. Si raccomanda all'utente di confermare varianti nuove e rare mediante un metodo di riferimento convalidato.

5 Come per qualsiasi saggio basato su ibridazione, polimorfismi o mutazioni latenti nelle regioni che legano gli oligonucleotidi possono interessare gli alleli sondati e, di conseguenza, le identificazioni effettuate.

6 Se per un campione vengono identificate più di due varianti, si raccomanda di verificare il risultato ripetendo il campione usando il Sistema dello strumento con gDNA estratto fresco per escludere la contaminazione incrociata del campione.

NOTA: quando vengono rilevate due o più varianti deve essere presa in considerazione la determinazione delle fasi (phasing) per l'aplotipo. Questo saggio non può determinare se le varianti sono in cis/trans rispetto alle altre varianti.

7 Nel software MiSeq Reporter, tutte le inserzioni/delezioni saranno lasciate allineate in regioni omopolimeriche. Ad esempio, la variante 444delA verrà identificata come una delezione GA-TC mentre la delezione viene riportata in dbSNP come una delezione G-ATC. Un'eccezione a questo sono le 135 variazioni della fibrosi cistica elencate nel database CFTR2 come causanti la malattia (basato sull'elenco delle varianti al settembre 2013); tutti gli Indel in regioni omopolimeriche entro questo gruppo di variazioni sono riportati come corrispondenti al report delle varianti previste in base al database CFTR2[10].

8 Il saggio non può determinare se l'orientamento della variante PolyTG/PolyT si trova in cis/trans rispetto ad altre varianti. Per i pazienti con una variante R117H, dovrebbero essere eseguiti ulteriori test per determinare se una variante PolyTG/PolyT, che può incidere sul fenotipo clinico [ad. es., 12-13 (TG) o 5T], è in orientamento cis/trans.

— PolyTG/PolyT sono regioni omopolimeriche note per essere difficili da sequenziare a causa dello scivolamento della polimerasi.

9 Questo saggio è progettato per essere eseguito esclusivamente in un formato 8 plex. Se non sono disponibili 6 campioni clinici, esclusi i controlli positivo e negativo, includere quindi altri campioni di DNA genomico umano per completare la corsa.

Componenti del prodotto

La piattaforma MiSeqDx Illumina è composta da:

- Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing (n. di catalogo DX-102-1001)
- Strumento MiSeqDx (N. di catalogo DX-410-1001)

Reagenti

Reagenti forniti

I reagenti per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina (n. di catalogo DX-102-1001) sono forniti da Illumina. Questo kit è stato configurato per sei corse con un massimo di otto campioni per corsa (fino a 48 campioni totali).

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, Scatola 1

Tabella 3 Scatola 1A Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi	1 provetta	600 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente oligonucleotidi mirati al gene *CFTR*	tra -25 °C e -15 °C
Tampone di ibridazione	1 provetta	4,32 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e formammide	tra -25 °C e -15 °C
Miscela di estensione-ligazione	1 provetta	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente una miscela proprietaria di DNA polimerasi, DNA ligasi e dNTP	tra -25 °C e -15 °C
Primer indice C (A503), D (A504) e E (A505)	1 provetta per primer	192 µl	Primer per PCR con sequenze indice e adattatori di sequenziamento	tra -25 °C e -15 °C
Primer indice 1 (A701), 2 (A702) e 10 (A710)	1 provetta per primer	128 µl	Primer per PCR con sequenze indice e adattatori di sequenziamento	tra -25 °C e -15 °C
PCR polimerasi	1 provetta	56 µl	DNA polimerasi proprietaria	tra -25 °C e -15 °C
Master Mix per PCR	1 provetta	2,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e dNTP	tra -25 °C e -15 °C

Tabella 4 Scatola 1B Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Diluente normalizzazione libreria	1 provetta	4,6 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra -25 °C e -15 °C
Tampone di diluizione libreria	1 provetta	4,5 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C
Controllo interno PhiX	1 provetta	10 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA genomico PhiX	tra -25 °C e -15 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, Scatola 2

Tabella 5 Scatola 2 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Indice	Conservazione
Cartuccia di reagenti MiSeqDx - saggio CF Clinical Sequencing	6 cartucce	Cartuccia monouso che contiene i reagenti per la generazione dei cluster e il sequenziamento da utilizzarsi con MiSeqDx, compresi formammide, 2-mercaptoetanolo e DMSO < 2%.	tra -25 °C e -15 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, Scatola 3

Tabella 6 Scatola 3A Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Tampone di lavaggio stringente	1 flacone	24 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra 2 °C e 8 °C
Tampone di lavaggio universale	1 provetta	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	tra 2 °C e 8 °C

Tabella 7 Scatola 3B Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Microsfere per la pulizia della PCR	1 provetta	5 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida e polietilene glicole	tra 2 °C e 8 °C
Lavaggio di normalizzazione della libreria	2 provette	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra 2 °C e 8 °C
Microsfere libreria	1 provetta	1,2 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida	tra 2 °C e 8 °C
Cella a flusso MiSeqDx - saggio CF Clinical Sequencing	6 contenitori	1 cella a flusso	Substrato di vetro con oligonucleotidi legati covalentemente	tra 2 °C e 8 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, Scatola 4

Tabella 8 Scatola 4 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Soluzione SBS MiSeqDx (PR2) - saggio CF Clinical Sequencing	6 flaconi	353,1 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 2 °C e 8 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, Scatola 5

Tabella 9 Scatola 5 Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Piastra filtro	6 piastre	N.D.	Piastra di microtitolazione in polipropilene con una membrana di polietersulfone modificata	tra 15 °C e 30 °C

Tabella 10 Scatola 5 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Tampone di eluizione	1 provetta	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C
Tampone di conservazione della libreria	1 provetta	3,5 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C

Reagenti richiesti, non forniti

Reagenti pre-amplificazione

- 10 N NaOH (preparare da compresse o con una soluzione standard)
- Tampone TE
- Acqua priva di DNasi e di RNasi

Reagenti post-amplificazione

- 10 N NaOH (preparare da compresse o con una soluzione standard)
- Etanolo, 200 proof (vol. 100%) per biologia molecolare
- Tampone TE

- Acqua priva di DNasi e di RNasi

Conservazione e manipolazione

1. Per temperatura ambiente si intende la temperatura compresa fra 15 °C e 30 °C.
2. I reagenti elencati di seguito sono spediti congelati e rimangono stabili se conservati a una temperatura fra -25 °C e -15 °C fino alla data di scadenza specificata.
   - Saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi
   - Tampone di ibridazione
   - Miscela di estensione-ligazione
   - Primer indice C (A503), D (A504) e E (A505)
   - Primer indice 1 (A701), 2 (A702) e 10 (A710)
   - PCR polimerasi
   - Master Mix per PCR
   - Diluente normalizzazione libreria
   - Tampone di diluizione libreria
   - Controllo interno PhiX
   - Cartuccia di reagenti MiSeqDx - saggio CF Clinical Sequencing

   A eccezione della cartuccia di reagenti, i reagenti rimangono stabili per un massimo di 6 cicli di congelamento/scongelamento effettuati prima della data di scadenza specificata.

   Non ricongelare la cartuccia di reagenti una volta scongelata. Può essere conservata per un massimo di 6 ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.
3. I reagenti elencati di seguito sono spediti refrigerati e rimangono stabili se conservati a una temperatura tra 2 °C e 8 °C fino alla data di scadenza specifica.
   - Tampone di lavaggio stringente
   - Tampone di lavaggio universale
   - Microsfere per la pulizia della PCR
   - Microsfere libreria
   - Lavaggio di normalizzazione della libreria
   - Soluzione SBS MiSeqDx (PR2) - saggio CF Clinical Sequencing
   - Cella a flusso MiSeqDx - saggio CF Clinical Sequencing
4. I reagenti elencati di seguito sono spediti a temperatura ambiente e rimangono stabili se conservati a tale temperatura fino alla data di scadenza specificata.
   - Tampone di eluizione
   - Piastra filtro
   - Tampone di conservazione della libreria
5. Cambiamenti nell'aspetto fisico dei reagenti forniti possono indicare un deterioramento dei materiali. Non utilizzare i reagenti se si dovessero verificare tali cambiamenti (ad es. variazioni evidenti nel colore del reagente o opacità visibile con contaminazione microbica).
6. I reagenti del tampone di ibridazione, del tampone di lavaggio stringente e del diluente normalizzazione libreria potrebbero formare precipitati o cristalli visibili. Prima dell'uso, agitare energicamente, quindi ispezionare a occhio nudo per accertarsi che non vi sia presenza di precipitati.
7. Nella manipolazione di microsfere per la pulizia della PCR e microsfere libreria attenersi alle migliori pratiche riportate di seguito:
   - Le microsfere non devono mai essere congelate.
   - Riportarle a temperatura ambiente.
   - Immediatamente prima dell'uso, agitarle bene finché sospensione e colore appaiono omogenei.

- Dopo aver aggiunto le microsfere miscelare bene il campione pipettando su e giù dieci volte. Per miscelare il campione è possibile utilizzare un agitatore.
- Incubare la miscela di microsfere/campione a temperatura ambiente per tutta la durata indicata.
- Seguire le istruzioni per l'uso del supporto magnetico. attendere che la soluzione diventi trasparente prima di aspirare. Tenere la piastra sul supporto magnetico durante l'aspirazione lenta del surnatante, facendo attenzione a non toccare le microsfere separate.

8. La piastra di amplificazione mediante PCR può restare sul termociclatore per tutta la notte, oppure può essere conservata a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per un massimo di due giorni. Prima di conservare la piastra a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C sigillarla bene.
9. Non congelare il reagente microsfere libreria o miscelarlo con il reagente diluente normalizzazione libreria se non vengono utilizzati immediatamente.
10. La piastra completa di normalizzazione della libreria può essere conservata a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 3 giorni.
11. La libreria di ampliconi raggruppati in pool può essere conservata tra a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 3 giorni.
12. Caricare immediatamente nella cartuccia del reagente un pool di ampliconi diluiti appena preparati. Se conservato, il pool di ampliconi diluiti può comportare una riduzione significativa della densità dei cluster.

Apparecchiatura e materiali

Apparecchiatura e materiali di consumo forniti, venduti separatamente

1. Strumento **MiSeqDx**, n. catalogo DX-410-1001
2. **Kit TruSeq Index Plate Fixture**, n. di catalogo FC-130-1005
3. **Kit TruSeq Index Plate Fixture& Collar,** n. di catalogo FC-130-1007
4. **Tappi sostitutivi per adattatore indice**, n. di catalogo DX-502-1003

Apparecchiatura e materiali richiesti, non forniti

Apparecchiatura e materiali per pre-amplificazione

1. **Blocco termico**: è necessario un blocco termico per una piastra a 96 pozzetti. Il blocco termico deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione. Sono accettabili i blocchi termici con coperchi riscaldati.
   - Intervallo di temperatura: ambiente da +5 °C a 99 °C
   - Regolazione della temperatura: ± 0,1 °C a 37 °C; ± 0,4 °C a 60 °C
2. **Incubatore di campioni**: è necessario un incubatore (forno per ibridazione). L'incubatore deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione.
   - Intervallo di temperatura: da 10 °C a 100 °C
   - Regolazione della temperatura: ± 0,2 °C
3. **Centrifuga da tavolo**: è necessaria una centrifuga da tavolo in grado ci mantenere la temperatura di 20 °C. Come specificato sopra, nell'area di post-amplificazione è necessaria un'altra centrifuga. Qualsiasi centrifuga per piastre che raggiunga le velocità previste dal protocollo (da 280 a 2.400 × g) è accettabile.
4. **Pipette di precisione**: è necessaria una serie di pipette di precisione. Come specificato sopra, nell'area di post-amplificazione è necessario un altro set. L'utilizzo di pipette di precisione è necessario per assicurare un'erogazione accurata di reagente e campione. È possibile utilizzare sia pipette monocanale che multicanale se calibrate regolarmente e precise entro un margine del 5% del volume stabilito.
5. **Materiali di consumo**: sono necessari i seguenti materiali di consumo.
   - Piastre skirted per PCR a 96 pozzetti, 0,2 ml, polipropilene, o equivalente
     NOTA: assicurarsi che la piastra a 96 pozzetti sia compatibile con il supporto magnetico.
   - Piastre di conservazione a 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)
   - Bacinella per soluzione, in PVC, priva di DNAasi e RNAasi (vaschetta)

- Sigillo adesivo in alluminio
- Sigillo per piastre PCR appropriato
- Punte di pipette dotate di barriera aerosol

Apparecchiatura e materiali per post-amplificazione

1. **Termociclatore**: è necessario un termociclatore. Il termociclatore deve essere dotato di un coperchio riscaldato e soddisfare le seguenti specifiche di prestazione:
   - Intervallo di controllo della temperatura: da 4 °C a 99 °C
   - Accuratezza del controllo: ± 0,25 °C da 35 °C a 99 °C
2. **Agitatore per micropiastre**: nell'area adibita al laboratorio post-amplificazione è necessario un agitatore di micropiastre. L'agitatore di piastre deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione:
   - Velocità massima di miscelazione: 3.000 rpm (giri/min)
   - Intervallo di velocità di miscelazione: 200-3.000 rpm (giri/min)
3. **Centrifuga da tavolo**: è necessaria una centrifuga da tavolo in grado ci mantenere la temperatura di 20 °C. Come specificato sopra, nell'area di pre-amplificazione è necessaria un'altra centrifuga. Qualsiasi centrifuga per piastre che raggiunga le velocità previste dal protocollo (da 280 a 2.400 × g) è accettabile.
4. **Blocco termico**: è necessario un blocco termico per le provette. Il blocco termico deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione.
   - Intervallo di temperatura: ambiente da +5 °C a 99 °C
   - Regolazione della temperatura: ± 0,1 °C a 37 °C; ± 0,4 °C a 60 °C
5. **Supporto magnetico**: è necessario un supporto magnetico per una piastra a 96 pozzetti. Le prestazioni migliori si osservano quando i magneti si trovano sul lato del supporto e non nella parte inferiore.
6. **Pipette di precisione**: è necessaria una serie di pipette di precisione. Come specificato sopra, nell'area di pre-amplificazione è necessario un altro set. L'utilizzo di pipette di precisione è necessario per assicurare un'erogazione accurata di reagente e campione. È possibile utilizzare sia pipette mono-canale che multi-canale se calibrate regolarmente e precise entro un margine del 5% del volume stabilito.
7. **Materiali di consumo**: sono necessari i seguenti materiali di consumo.
   - Piastre skirted per PCR a 96 pozzetti, 0,2 ml, polipropilene, o equivalente
   - Piastre di conservazione a 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)
     NOTA: assicurarsi che la piastra a 96 pozzetti sia compatibile con il supporto magnetico.
   - Provette coniche, 15 ml
   - Provette per microcentrifuga Eppendorf (sono consigliate quelle con tappo a vite)
   - Striscia a otto provette per PCR
   - Bacinelle per soluzione, in PVC, priva di DNAasi e RNAasi (vaschetta)
   - Sigilli adesivi in alluminio
   - Sigilli adesivi per piastre
   - Punte di pipette dotate di barriera aerosol

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

NOTA
Maneggiare tutti campioni come se fossero agenti potenzialmente infettivi.

1. Possono essere utilizzati campioni di sangue intero prelevati in provette K_2 EDTA.
2. I campioni di sangue intero possono essere conservati per non più di sette giorni a temperatura ambiente, fino a 30 giorni a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C o fino a 30 giorni se congelati tra -25 °C e -15 °C.
3. I campioni di sangue intero possono essere trasportati per non più di sette giorni a temperatura ambiente, fino a 30 giorni a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C, o fino a 30 giorni se congelati fra -25 °C e -15 °C. Il trasporto di sangue intero deve essere conforme alle regolamentazioni nazionali, federali, statali o locali per il trasporto di agenti eziologici.

4. Non sono stati osservati eventi avversi sulle prestazioni dei saggio allorché il DNA genomico è stato sottoposto a sei cicli di congelamento/scongelamento.
5. Non sono stati osservati eventi avversi sulle prestazioni del saggio in presenza di campioni di sangue intero con elevati tassi di bilirubina, colesterolo, trigliceride, EDTA o emoglobina.

Avvertenze e precauzioni

ATTENZIONE
La legge federale limita la vendita di questo dispositivo da parte o dietro prescrizione di un medico o di un medico autorizzato dalla legge dello stato in cui esercita, ad usare o ad ordinare l'uso del dispositivo.

1. Alcuni componenti di questo saggio contengono formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. Per maggiori informazioni, vedere *Reagenti* a pagina 6. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Smaltire i contenitori e i contenuti non utilizzati conformemente alle norme di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.
2. Alcuni componenti di questo saggio contengono 2-mercaptoetanolo, un agente riducente. Per maggiori informazioni, vedere *Reagenti* a pagina 6. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Utilizzarlo in un'area ben ventilata e smaltire i contenitori e i contenuti non utilizzati conformemente alle norme di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.
3. Maneggiare tutti campioni come se fossero agenti potenzialmente infettivi.
4. Il mancato rispetto delle procedure descritte può produrre risultati errati o una riduzione significativa della qualità del campione.
5. Adottare le normali precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare nelle aree designate per il lavoro. Manipolare i campioni e i reagenti del saggio indossando guanti e indumenti da laboratorio monouso. Dopo aver maneggiato i campioni e i reagenti del saggio lavarsi bene le mani.
6. Non utilizzare i componenti del saggio oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione del saggio. Non scambiare i componenti di diversi lotti di saggi. I lotti di saggi sono identificati sull'etichetta della confezione del saggio.
7. Conservare i componenti del saggio alla temperatura indicata e in aree designate per la pre-amplificazione e la post-amplificazione.
8. Cicli ripetuti di congelamento-scongelamento (fino a 6) dei componenti dalla scatola 1 non compromettono l'integrità del saggio.
9. Onde evitare il degrado del campione o del reagente, accertarsi che tutti i vapori di sodio ipoclorito si siano dissipati completamente prima di iniziare il protocollo.
10. È necessario adottare idonee pratiche di laboratorio e una valida igiene per impedire la contaminazione di reagenti, strumenti e campioni di DNA genomico con i prodotti della PCR. La contaminazione da PCR può produrre risultati inesatti e inaffidabili.
11. Al fine di prevenire la contaminazione, accertarsi che le aree di pre-amplificazione e post-amplificazione siano dotate delle apposite attrezzature (ad es., pipette, punte di pipette, agitatori e centrifughe).
12. Evitare la contaminazione incrociata. Utilizzare punte di pipette nuove fra un campione e l'altro e fra le erogazioni di reagenti. Miscelare i campioni con una pipetta e centrifugare la piastra ove indicato. Non agitare le piastre. L'utilizzo di punte dotate di barriera aerosol riduce il rischio di contaminazione incrociata da carry-over di ampliconi o da campione a campione.
13. Le combinazioni indice-campione devono corrispondere esattamente a quelle del foglio campioni. La non corrispondenza fra il foglio campioni e il layout della piastra risulterà in una perdita di identificazione dei campioni positivi e nella refertazione di risultati errati.
14. Preparare sempre al momento l'etanolo all'80% per le fasi di lavaggio. L'etanolo può assorbire l'acqua dall'aria e influire sui risultati.

15 Assicurarsi che tutto l'etanolo venga rimosso dal fondo dei pozzetti durante le fasi di lavaggio. L'etanolo residuo può influire sui risultati.
16 Rispettare il tempo di asciugatura indicato dopo la fase del supporto magnetico al fine di garantire che l'evaporazione sia completa. L'etanolo residuo può influire sulle prestazioni delle reazioni successive.
17 Non mescolare il saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi e il tampone di ibridazione per la conservazione. Usato in combinazione, il saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi diventa instabile, anche se conservato congelato.
18 L'utilizzo di termociclatori a raffreddamento attivo (ad es., Peltier, raffreddato termoelettricamente) non è consigliato per la fase di ibridazione. La fase di raffreddamento passivo è cruciale per un'adeguata ibridazione.
19 Aggiungere sempre PCR polimerasi al Master Mix per PCR subito prima dell'uso. Non conservare mai la soluzione di lavoro combinata.
20 Durante la fase di normalizzazione della libreria, è estremamente importante risospendere completamente il pellet di microsfere della libreria. Questo è fondamentale per ottenere una densità dei cluster omogenea sulla cella a flusso MiSeqDx.
21 Rispettare i tempi di incubazione specificati per la fase di normalizzazione della libreria. Un'incubazione inadeguata può influire sulla rappresentazione della libreria e sulla densità dei cluster.
22 A causa del numero di trasferimenti della piastra e della conseguente potenziale contaminazione, è importante fare molta attenzione per assicurare che il contenuto dei pozzetti rimanga totalmente al loro interno. Non far schizzare il contenuto.
23 L'input di DNA di 250 ng raccomandato permette la variazione della quantità del DNA; le prestazioni del saggio si basano su questo livello di input.

Note sulle procedure

1 Illumina ritiene necessario che per ogni corsa, definita come una serie di campioni elaborati in parallelo, vengano inclusi un campione di DNA di controllo positivo e un controllo negativo (NTC o No Template Control, controllo senza templato). Il campione di DNA di controllo positivo deve essere un campione ben caratterizzato con una o più mutazioni note del gene *CFTR*. Illumina raccomanda di usare un controllo wild type. Il controllo wild type deve essere eseguito come un campione e non deve sostituire il controllo positivo o negativo.
2 Prima di iniziare il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, estrarre e quantificare il DNA.
3 È possibile utilizzare qualsiasi metodo di estrazione del DNA approvato.
4 Quantificare il DNA con uno spettrofotometro. Verificare che il rapporto A260/A280 del campione di DNA sia > 1,5. Normalizzare il campione di DNA a 50 ng/µl. Per ciascun campione sono necessari 5 µl di DNA genomico (250 ng totali).

Rendimento dei campioni e rappresentazione dell'indice

Per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina, il rendimento dei campioni per corsa di MiSeqDx è di 8 campioni. I primer di indicizzazione usati durante l'amplificazione mediante PCR devono essere scelti in base al rendimento dei campioni finale desiderato per garantire diversità nella sequenza d'indice.

MiSeqDx utilizza un LED verde per il sequenziamento delle basi G/T e un LED rosso per il sequenziamento delle basi A/C. Per garantire la corretta registrazione, a ogni corsa deve essere letto almeno uno dei due nucleotidi per ogni canale cromatico. È importante conservare l'equilibrio cromatico per ciascuna base di lettura indici sequenziata, altrimenti potrebbe verificarsi un problema di registrazione durante il sequenziamento della Lettura indici.

Utilizzare il seguente set minimo di indici con bilanciamento dei colori per corse di sequenziamento di otto campioni:

Tabella 11 Combinazioni primer indice per corse di sequenziamento a 8 campioni

	Primer indice 1 (A701)	Primer indice 2 (A702)	Primer indice 10 (A710)
Primer indice C (A503)	Campione 1	Campione 2	Campione 3
Primer indice D (A504)	Campione 4	Campione 5	Campione 6
Primer indice E (A505)	Campione 7	Campione 8	--

Se non sono disponibili sei campioni univoci (esclusi i controlli positivi e negativi), è accettabile completare la corsa con replicati di qualsiasi campione di DNA genomico umano.

Istruzioni per l'uso

Preparazione del foglio campioni per MiSeqDx

1 Nella schermata Welcome (Benvenuto) di Worklist Manager Illumina, selezionare **Create Worklist** (Crea lista di lavoro).
2 Nel campo Test Type (Tipo di test), selezionare **CF Clinical Sequencing Assay** (Saggio CF Clinical Sequencing).
3 Nel campo Worklist Name (Nome lista di lavoro), immettere il nome per il foglio campioni.
   — Se per il nome del foglio campioni viene utilizzato l'ID alfanumerico del codice a barre della cartuccia di reagenti, il software operativo MiSeq (MOS) troverà automaticamente il foglio campioni.
   — Se per il foglio campioni viene utilizzato un qualsiasi altro nome, il pulsante **Browse** (Sfoglia) nel software operativo MiSeq (MOS) può essere utilizzato per trovare il foglio campioni corretto.
4 [Opzionale] Immettere una descrizione per identificare la corsa.
5 Assicurarsi che la data corrisponda alla data di inizio della corsa.
6 Selezionare **Next** (Avanti).

Inserimento di informazioni sui campioni

1 Nella scheda Table (Tabella) o nella scheda Plate (Piastra), inserire le seguenti informazioni per ciascun pozzetto contenente campione:
   a **Sample ID** (ID campione): inserire un ID campione univoco.
   b **Index 1 e Index 2** (Indice 1 e Indice 2): specificare l'adattatore dell'indice che verrà utilizzato per ogni Lettura indici.
2 [Opzionale] Per registrare informazioni più dettagliate sui campioni, inserire il nome e la descrizione di un campione.
3 [Opzionale] Per identificare i controlli sulla piastra, selezionare Negative (Negativo) o Positive (Positivo) dal menu a discesa **Control** (Controllo).
4 Andare alla scheda Plate Graphic (Schema piastra) e utilizzare l'opzione **Copy to Clipboard** (Copia in appunti) o **Print** (Stampa) per acquisire un'immagine della piastra campioni.
5 Selezionare **Finish** (Fine).

Ibridazione del pool di oligonucleotidi

Preparazione

1 Portare a temperatura ambiente il saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi, il tampone di ibridazione, i campioni di DNA genomici e il campione di controllo positivo.
2 Inserire in un agitatore il saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi e il tampone di ibridazione e agitare vigorosamente per assicurarsi che tutti i precipitati si siano completamente disciolti, quindi centrifugare brevemente le provette per raccogliere il liquido.
3 Impostare un blocco termico per piastra a 96 pozzetti su 95 °C.

4 Preriscaldare un incubatore a 37 °C.
5 Creare la piastra campioni in base all'immagine stampata da IWM.

Procedura

1 Impostare una nuova piastra PCR a 96 pozzetti (di seguito definita piastra **HYB**).
2 Aggiungere 5 µl di campione o controllo a 50 ng/µl (250 ng totali) ai pozzetti appropriati nella piastra **HYB**. Seguire il layout della piastra generato per la corretta selezione dei pozzetti.
3 Aggiungere 5 µl del saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi a tutti i pozzetti contenenti il DNA genomico.
4 Aggiungere 40 µl di tampone di ibridazione a ogni campione nella piastra **HYB**. Pipettare delicatamente su e giù 3-5 volte per miscelare.
5 Sigillare la piastra **HYB** e centrifugare 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
6 Inserire la piastra **HYB** nel blocco preriscaldato a 95 °C e incubare per 1 minuto.
7 Ridurre la temperatura del blocco termico a 40 °C e continuare a incubare fino a quando il blocco termico raggiunge 40 °C (circa 80 minuti).
Il raffreddamento graduale è essenziale per un'ibridazione corretta; pertanto, per questo processo non si consigliano termociclatori per PCR con raffreddamento attivo (ad es., Peltier, raffreddato termoelettricamente).

PUNTO DI ARRESTO SICURO
Quando il blocco termico raggiunge i 40 °C, la piastra **HYB** è stabile a una temperatura di 40 °C per 2 ore.

Rimozione degli oligonucleotidi non legati

Preparazione

1 Portare la miscela di estensione-ligazione, il tampone di lavaggio stringente e il tampone di lavaggio universale a temperatura ambiente e agitare brevemente.
2 Assemblare l'unità piastra filtro (d'ora in avanti denominata **FPU**) nell'ordine dall'alto verso il basso: coperchio, piastra filtro, colletto adattatore e piastra MIDI.
3 Pre-lavare la membrana della piastra filtro come segue:
   a Dispensare 45 µ di tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto.
   b Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 5 minuti.

Procedura

1 Estrarre la piastra **HYB** dal blocco termico e centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
2 Trasferire tutto il volume di ciascun campione (circa 55 µl) nei corrispondenti pozzetti della piastra filtro.
3 Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 5 minuti.
4 Lavare la piastra filtro come segue:
   a Dispensare 45 µ di tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto contenente il campione.
   b Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 5 minuti.
5 Ripetere il lavaggio come descritto nella fase precedente.

NOTA
Se il tampone di lavaggio non asciuga completamente, centrifugare di nuovo a 2.400 x g a 20 °C finché tutto il liquido non viene espulso (ulteriori 5-10 minuti).

6 Smaltire tutto il materiale defluito (contenente formammide), quindi riassemblare l'**FPU**.
7 Dispensare 45 µ di tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto contenente il campione.
8 Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 10 minuti.

NOTA
Accertarsi che tutto il liquido sia defluito dopo la centrifugazione. Ripetere la centrifugazione se necessario.

Estensione-ligazione degli oligonucleotidi legati

Procedura

1. Aggiungere 45 µl di miscela di estensione-ligazione a ogni pozzetto di campione della piastra filtro.
2. Sigillare la piastra filtro con un foglio di allumino adesivo e quindi coprire con il coperchio.
3. Incubare l'unità **FPU** nell'incubatore preriscaldato a 37 °C per 45 minuti.

Amplificazione mediante PCR

Preparazione

1. Preparare 0,05 N di NaOH fresco.
2. Determinare i primer indice da utilizzare in base alla stampa dello schema della piastra di Worklist Manager Illumina.
3. Portare Master Mix per PCR e i primer indice appropriati a temperatura ambiente. Agitare ogni provetta scongelata per miscelare e quindi centrifugare brevemente le provette.
4. Impostare una nuova piastra PCR a 96 pozzetti (di seguito definita piastra **AMP**).
5. Dispensare i primer indice sulla piastra **AMP** in base al foglio campioni come segue:
   a. Dispensare 4 µl dei primer indice C (A503), D (A504) e E (A505) nei pozzetti appropriati in una colonna della piastra **AMP**.
   b. Smaltire i tappi bianchi originali e applicare tappi bianchi nuovi.
   c. Dispensare 4 µl dei primer indice selezionati 1 (A701), 2 (A702) e 10 (A710) nei pozzetti appropriati in una riga della piastra **AMP**. ***Le punte devono essere sostituite dopo ogni riga per evitare la contaminazione incrociata.***
   d. Smaltire i tappi arancioni originali e applicare tappi arancioni nuovi.
6. Preparare la soluzione di lavoro per la PCR con Master Mix per PCR/PCR polimerasi nel modo seguente:
   a. Dispensare 5,6 µl di PCR polimerasi su 280 µl di Master Mix per PCR.
   b. Capovolgere 20 volte la soluzione di lavoro per la PCR preparata per miscelarla.

Procedura

1. Rimuovere la piastra **FPU** dall'incubatore e rimuovere il sigillo in alluminio.
2. Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 2 minuti.
3. Aggiungere 25 µl di 0,05 N di NaOH a ogni pozzetto di campione sulla piastra filtro. Pipettare NaOH su e giù 5-6 volte.
4. Coprire e incubare la piastra filtro a temperatura ambiente per 5 minuti.
5. Durante l'incubazione della piastra filtro, trasferire 22 µl della soluzione di lavoro per PCR in ogni pozzetto della piastra AMP contenente i primer indice.
6. Trasferire i campioni eluiti dal filtro alla piastra AMP come segue:
   a. Pipettare i campioni nella prima colonna della piastra filtro su e giù 5-6 volte.
   b. Trasferire 20 µl dalla piastra filtro alla colonna corrispondente della piastra **AMP**.
   c. Pipettare delicatamente su e giù 5-6 volte per miscelare accuratamente il DNA con la soluzione di lavoro per PCR.
   d. Trasferire le colonne restanti dalla piastra filtro alla piastra **AMP** in modo simile. ***Le punte devono essere sostituite dopo ogni colonna per evitare la contaminazione incrociata.***
7. Sigillare la piastra **AMP** e assicurarla con un rullo di gomma.
8. Centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
9. Trasferire la piastra **AMP** nell'area di post-amplificazione.
10. Eseguire la PCR utilizzando il seguente programma su un termociclatore:
    — 95 °C per 3 minuti
    — 25 cicli di:

- — 95 °C per 30 secondi
  - — 62 °C per 30 secondi
  - — 72 °C per 60 secondi
- — 72 °C per 5 minuti
- — Mantenere a 10 °C

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se non si procede immediatamente alla pulizia della PCR, la piastra **AMP** può restare sul termociclatore per la notte oppure può essere conservata a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per massimo 48 ore.

Pulizia della PCR

Preparazione

1. Portare le microsfere per la pulizia della PCR a temperatura ambiente.
2. Preparare al momento etanolo all'80% a partire dall'etanolo assoluto.

Procedura

1. Centrifugare la piastra AMP a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
2. Impostare una nuova piastra MIDI (di seguito definita piastra **CLP**).
3. Capovolgere 10 volte le microsfere per la pulizia della PCR. Agitare energicamente e quindi capovolgere altre 10 volte. Controllare visivamente la soluzione per assicurarsi che le microsfere siano risospese.
4. Aggiungere 45 µl di microsfere per la pulizia della PCR a ogni pozzetto di campione della piastra **CLP**.
5. Trasferire l'intero prodotto per PCR dalla piastra AMP alla piastra **CLP**.
6. Sigillare la piastra **CLP** e agitare su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 2 minuti.
7. Incubare a temperatura ambiente senza agitare per 10 minuti.
8. Posizionare la piastra su un supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o fino alla scomparsa del surnatante.
9. Con la piastra **CLP** sul supporto magnetico, rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
10. Con la piastra **CLP** sul supporto magnetico, lavare le microsfere come segue:
    a. Dispensare 200 µl di etanolo all'80% appena preparato in ogni pozzetto contenente il campione.
    b. Incubare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 30 secondi o finché il surnatante è limpido.
    c. Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
11. Ripetere il lavaggio come descritto nella fase precedente.
12. Utilizzare una pipetta multicanale P20 impostata su 20 µl per rimuovere l'eccesso di etanolo.
13. Rimuovere la piastra **CLP** dal supporto magnetico e asciugare all'aria le microsfere per 10 minuti.
14. Dispensare 30 µ di tampone di eluizione in ciascun campione e agitare brevemente.
15. Sigillare la piastra **CLP** e agitare su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 2 minuti. Dopo aver agitato, controllare che i campioni siano risospesi. Altrimenti, ripetere questo passaggio.
16. Incubare a temperatura ambiente per 2 minuti.
17. Posizionare la piastra **CLP** sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è limpido.
18. Impostare una nuova piastra MIDI (di seguito definita piastra **LNP**).
19. Trasferire 20 µl di surnatante dalla piastra **CLP** alla piastra **LNP**.
20. [Opzionale] Trasferire i restanti 10 µl di surnatante dalla piastra **CLP** a una nuova piastra ed etichettare la piastra con il nome della corsa e la data. Conservare questa piastra a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C fino al completamento della corsa di sequenziamento e analisi dei dati. I prodotti per PCR puliti possono essere usati per scopi di ricerca ed eliminazione guasti in caso di problemi a carico dei campioni.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se ci si ferma a questo punto, sigillare la piastra **LNP** e centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto. La piastra è stabile per un massimo di 3 ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

Normalizzazione della libreria

Preparazione

1. Preparare 0,1N di NaOH fresco.
2. Portare il diluente normalizzazione libreria, le microsfere libreria e il lavaggio di normalizzazione della libreria a temperatura ambiente.
3. Agitare il diluente normalizzazione libreria energicamente e assicurarsi che tutti i precipitati si siano completamente sciolti.
4. Agitare le microsfere libreria energicamente per 1 minuto con inversione intermittente fino a risospensione delle microsfere e assenza di pellet sul fondo della provetta quando quest'ultima viene capovolta.

Procedura

1. Miscelare il diluente normalizzazione libreria e le microsfere libreria in una provetta nuova da 1,5 ml come segue:
   a. Dispensare 394 µl di diluente normalizzazione libreria.
   b. Pipettare le microsfere libreria su e giù 10 volte per risospenderle.

   NOTA
   È fondamentale risospendere completamente il pellet di microsfere della libreria in fondo alla provetta. L'uso di una provetta P1000 garantisce che le microsfere vengano risospese in modo omogeneo e che non ci sia massa di microsfere sul fondo della provetta. Questo è fondamentale per ottenere una densità dei cluster omogenea sulla cella a flusso.

   c. Pipettare 72 µl di microsfere libreria nella provetta contenente diluente normalizzazione libreria.
   d. Miscelare capovolgendo la provetta 15-20 volte.
2. Dispensare 45 µl della soluzione di lavoro di diluente normalizzazione libreria/microsfere libreria combinata in ogni pozzetto della piastra **LNP** contenente le librerie.
3. Sigillare la piastra **LNP** e agitare su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 30 minuti.
4. Posizionare la piastra su un supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o fino alla scomparsa del surnatante.
5. Con la piastra **LNP** sul supporto magnetico, rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
6. Rimuovere la piastra **LNP** dal supporto magnetico e lavare le microsfere con il lavaggio di normalizzazione della libreria come segue:
   a. Dispensare 45 µ di lavaggio di normalizzazione della libreria in ciascun pozzetto contenente il campione.
   b. Sigillare la piastra **LNP** e agitare su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 5 minuti.
   c. Posizionare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è limpido.
   d. Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
7. Ripetere la procedura del lavaggio di normalizzazione della libreria come descritto nella fase precedente.
8. Utilizzare una pipetta multicanale P20 impostata su 20 µl per rimuovere l'eccesso di lavaggio di normalizzazione della libreria.
9. Rimuovere la piastra **LNP** dal supporto magnetico e dispensare 30 µl di 0,1 N di NaOH in ogni pozzetto.
10. Sigillare la piastra **LNP** e agitare su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 5 minuti.
11. Durante l'eluizione di 5 minuti, impostare una nuova piastra PCR con 96 pozzetti (di seguito definita piastra **SGP**).
12. Dispensare 30 µl di tampone di conservazione della libreria a ciascun pozzetto da usare nella piastra **SGP**.
13. Dopo l'eluizione di 5 minuti, assicurarsi che tutti i campioni nella piastra **LNP** siano completamente risospesi. Se i campioni non sono completamente risospesi, pipettare delicatamente i campioni su e giù oppure battere delicatamente la piastra sul banco per risospendere le microsfere, quindi agitare per altri 5 minuti.

14 Posizionare la piastra **LNP** sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti.
15 Trasferire il surnatante dalla piastra **LNP** alla piastra **SGP**. Pipettare delicatamente su e giù 5 volte per miscelare.
16 Sigillare la piastra **SGP** e centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.

PUNTO DI ARRESTO SICURO
Qualora non si proceda immediatamente alla creazione di un pool di librerie e al successivo sequenziamento su MiSeqDx, conservare la piastra **SGP** sigillata tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 3 giorni.

Creazione di pool di librerie

Preparazione del pool di librerie

1 Predisporre un blocco termico adatto a centrifugare provette da 1,5 ml a 96 °C.
2 In un portaghiaccio, preparare un bagno di acqua e ghiaccio. Raffreddare il tampone di diluizione libreria nel bagno di acqua e ghiaccio.
3 Cominciare a scongelare la cartuccia di reagenti MiSeqDx.

Preparazione di una soluzione di diluizione fresca di NaOH

ATTENZIONE
L'utilizzo di una soluzione di diluizione fresca di NaOH è essenziale per denaturare completamente i campioni in vista della generazione dei cluster sul dispositivo MiSeqDx.

1 Combinare i seguenti volumi in una provetta per microcentrifuga:
  — Acqua priva di DNAsi e di RNAsi (900 µl)
  — 1,0 N di NaOH (100 µl)
2 Capovolgere la provetta diverse volte per miscelare.

Denaturazione e diluizione del controllo interno PhiX

1 Combinare i seguenti volumi per diluire la libreria del controllo interno PhiX a 2 nM:
  — Libreria del controllo interno PhiX da 10 nM (2 µl)
  — 1X tampone TE (8 µl)
2 Combinare i seguenti volumi per ottenere una libreria del controllo interno PhiX da 1 nM:
  — Libreria del controllo interno PhiX da 2 nM (10 µl)
  — 0,1 N NaOH (10 µl)
3 Inserire brevemente in un agitatore per miscelare la soluzione della libreria del controllo interno PhiX da 1 nM.
4 Centrifugare la soluzione di templato a 280 x g a 20 °C per 1 minuto.
5 Incubare per 4,5 minuti a temperatura ambiente per denaturare la libreria del controllo interno PhiX in filamenti singoli.
6 Aggiungere il seguente volume di tampone di diluizione libreria pre-raffreddato nella provetta contenente la libreria del controllo interno PhiX denaturata per ottenere una libreria del controllo interno PhiX da 20 pM.
  — Libreria del controllo interno PhiX denaturata (20 µl)
  — Tampone di diluizione libreria pre-raffreddato (980 µl)

Preparazione della cartuccia di reagenti

1 Scongelare la cartuccia di reagenti MiSeqDx - saggio CF Clinical Sequencing in un bagnomaria contenente abbastanza acqua deionizzata a temperatura ambiente così da immergere la base della cartuccia di reagenti fino alla linea di livello acqua stampata sulla cartuccia stessa. Evitare che l'acqua superi la linea di massimo livello acqua.
2 Lasciare la cartuccia di reagenti a scongelare a bagnomaria a temperatura ambiente per circa un'ora o fino a completo scongelamento.

3 Rimuovere la cartuccia dal bagnomaria e batterla delicatamente sul banco per far fuoriuscire l'acqua in eccesso dalla base. Asciugare la base della cartuccia. Verificare che sulla parte superiore della cartuccia di reagenti non sia caduta dell'acqua.

Ispezione della cartuccia di reagenti

1 Capovolgere la cartuccia dieci volte per miscelare i reagenti scongelati e poi ispezionare visivamente tutti i serbatoi per accertarsi che siano scongelati.

NOTA
È fondamentale che i reagenti nella cartuccia siano scongelati completamente e miscelati per assicurare il sequenziamento corretto.

2 Ispezionare visivamente il reagente nella posizione 1 per accertarsi che sia ben miscelato e privo di precipitati.
3 Battere delicatamente la cartuccia sul banco per ridurre le bolle d'aria nei reagenti.

NOTA
I tubi dei pescanti del MiSeqDx vanno fino al fondo di ciascun serbatoio per aspirare i reagenti, per questa ragione è importante che i serbatoi non contengano bolle.

4 Riporre la cartuccia in ghiaccio o conservarla a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C (fino a 6 ore) finché non si è pronti a impostare la corsa. Per risultati ottimali, procedere direttamente caricando il campione e impostando la corsa.

Preparazione dei campioni per il sequenziamento

1 Portare il tampone di diluizione libreria a temperatura ambiente. Agitare il tampone di diluizione libreria energicamente e assicurarsi che tutti i precipitati si siano completamente sciolti.
2 Se la piastra **SGP** è stata conservata congelata, scongelarla la piastra **SGP** fino a raggiungere la temperatura ambiente.
3 Centrifugare la piastra **SGP** a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
4 Predisporre una provetta Eppendorf nuova (d'ora in avanti indicata come provetta **PAL**).
5 Se la piastra **SGP** è stata conservata congelata, mescolare ciascuna libreria da sequenziare pipettando su e giù per 3-5 volte.
6 Trasferire 5 µl di ciascuna libreria da sequenziare dalla piastra **SGP** a una striscia a otto provette per PCR. Sigillare l'**SGP** con un sigillo adesivo per piastre e metterla da parte.

NOTA
Dopo l'uso, conservare la piastra **SGP** fra -25 °C e -15 °C. La piastra **SGP** sigillata rimane stabile per un massimo di 3 giorni.

7 Combinare e trasferire il contenuto della striscia a otto provette per PCR nella provetta **PAL**. Miscelare energicamente la provetta **PAL** in un agitatore.
8 Predisporre una provetta Eppendorf nuova (d'ora in avanti indicata come provetta **DAL**).
9 Dispensare 585 µl di tampone di diluizione libreria nella provetta **DAL**.
10 Dispensare 6 µl di controllo interno PhiX 20 pM nella provetta **DAL**. Pipettare su e giù per 3-5 volte per sciacquare la punta e assicurare che il trasferimento sia completo.
11 Trasferire 9 µl di **PAL** nella provetta **DAL** contenente il tampone di diluizione libreria. Pipettare su e giù per 3-5 volte per sciacquare la punta e assicurare che il trasferimento sia completo.
12 Mescolare la **DAL** agitando la provetta molto velocemente.
13 Centrifugare la provetta **DAL** a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
14 Incubare la provetta **DAL** in un blocco termico a 96 °C per 2 minuti.
15 Dopo l'incubazione, capovolgere la provetta **DAL** 1-2 volte per mescolarla, quindi porla immediatamente in un bagno di acqua e ghiaccio.
16 Tenere la provetta **DAL** nel bagno di acqua e ghiaccio per 5 minuti.

Caricamento delle librerie di campioni nella cartuccia

1. Utilizzare la punta di una pipetta pulita e vuota da 1 ml per forare la capsula di alluminio che sigilla il serbatoio contrassegnato con la dicitura **Load Samples** (Caricamento campioni).
2. Pipettare 600 µl delle librerie di campioni nel serbatoio contrassegnato con la dicitura **Load Samples** (Caricamento campioni). Fare attenzione a evitare di toccare la capsula sigillante durante l'erogazione del campione.

   Una volta caricato il campione, verificare la presenza di bolle d'aria nel serbatoio. In caso di presenza di bolle d'aria, picchiettare delicatamente la cartuccia sul banco in modo da farle fuoriuscire.
3. Passare direttamente alla procedura di impostazione della corsa usando l'interfaccia del software operativo MiSeq (MOS).

Interpretazione dei risultati

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina è progettato per sequenziare le regioni di codifica delle proteine nel gene *CFTR* su 27 esoni, tra 5 e 30 basi di sequenza intronica fiancheggiante, circa 100 nt di sequenza intronica fiancheggiante le regioni non tradotte (UTR) 5' e 3' e due mutazioni introniche profonde (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T). Le esatte regioni sequenziate sono elencate nella Tabella 2. Inoltre il saggio riporta la variante PolyTG/PolyT e 2 delezioni ampie (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23).

1. Il report del saggio elenca i nomi dei campioni e il genotipo per ciascuna variante rilevata per un campione.
   - Per ciascuna variante sono riportati la coordinata genomica, il nome cDNA della Human Genome Variation Society (HGVS) e il nome della proteina (se disponibile).
   - Il tipo di variante è identificata come una variante di singolo nucleotide (SNV), una variante di delezione/inserzione (DIV), una variante PolyTGPolyT (PolyTGPolyT) o una delezione ampia (DEL).
   - L'identificazione dei genotipi (eterozigoti o omozigoti) può essere dedotta dalle informazioni della base di "riferimento", che forniscono la sequenza di riferimento a quella coordinata genomica, e la descrizione del "risultato" che fornisce i due alleli alla posizione genomica nel campione, possono interferire sull'identificazione del genotipo (se eterozigote o omozigote). Ad esempio, se Reference (Riferimento) è G e Result (Risultato) è A/G, questo indica un cambiamento G>A a quella coordinata genomica e che il genotipo è eterozigote per l'allele della variante. Nello stesso modo, se Reference (Riferimento) è G e Result (Risultato) è T/T, questo indica un cambiamento G>T a quella coordinata genomica e che il genotipo è omozigote per l'allele della variante.
   - La profondità di sequenziamento alla posizione della variante è fornita dal campo Depth (Profondità) e la frequenza allelica nella sezione Frequency (Frequenza).
2. Il report del saggio fornisce informazioni sulla percentuale di identificazione del campione per ciascun campione. La percentuale di identificazione è calcolata come il numero di posizioni/regioni della variante che corrisponde a un valore di soglia di affidabilità predefinito per il numero totale di posizioni/regioni interrogate.
   - La coordinata genomica per qualsiasi posizione o regione per la quale il valore di affidabilità è inferiore alla soglia è elencato separatamente nella sezione Coordinates not called (Coordinate non identificate). Gli utenti devono valutare le posizioni non identificate rispetto alle informazioni rilevanti sulla variante per identificare le varianti che possono essere state non identificate e rispetto alle frequenze di popolazione corrispondenti per determinare se è necessario ripetere il campione.
3. Il risultato ottenuto viene considerato valido solo se la percentuale di identificazione è ≥ 99%. Se la percentuale di identificazione è inferiore a 99%, la prestazione verrà riportata come Fail (Non superato) e il campione deve essere ripetuto.
4. Si raccomanda all'utente di verificare qualsiasi variante che non rientra in ciò che è stato convalidato nello studio di accuratezza (vedere *Accuratezza* a pagina 23) usando un metodo di riferimento convalidato prima di refertare il primo risultato del paziente con quelle varianti.

NOTA: quando vengono rilevate due o più varianti deve essere presa in considerazione la determinazione delle fasi (phasing) per l'aplotipo.

5. Tutte le interpretazioni delle varianti devono essere eseguite da un genetista molecolare certificato o equivalente attendendosi alle procedure e linee guida locali[11]. I riferimenti potenziali per l'interpretazione includono, ma non sono limitati a: database CFTR2[12,13], classificazione di Sosnay[10], linee guida 2004 dell'ACMG[14] e opinione 2011 della commissione ACOG[8].

   Per informazioni su come vengono calcolati e presentati i risultati o per una descrizione del contenuto nel report dei file di testo, vedere la *Guida per l'utente di MiSeq Reporter (n. codice 15038356_ITA)*.
6. Il genetista può usare il software MiSeq Reporter per immettere un valore di interpretazione per ciascuna variante refertata su un campione usando un menu a discesa. Le opzioni per il valore di interpretazione sono: CF-causing (Che causa la CF), Mutation of varying clinical consequence (Mutazioni di varie conseguenze cliniche), Mutation of unknown significance (Mutazioni di significato sconosciuto) o Non-CF causing (Che non causa la CF). Il valore immesso verrà aggiunto al file dei risultati e visualizzato nella colonna delle interpretazioni sul report del saggio Clinical Sequencing.

Procedure per il controllo qualità

Le buone pratiche di laboratorio impongono che i materiali di controllo siano valutati per rilevare le differenze nell'elaborazione dei campioni e nelle procedure tecniche nel laboratorio dell'utente che potrebbero produrre una variabilità significativa nei risultati.

1. **Controlli positivi**: un campione di DNA di controllo positivo è richiesto su ciascuna corsa. Il campione di DNA di controllo positivo deve essere un campione ben caratterizzato con almeno una variante nota del gene CFTR[15]. Illumina raccomanda di usare i controlli positivi in rotazione coerenti con le linee guida e gli standard tecnici 2008 dell'ACMG per l'analisi delle mutazioni della fibrosi cistica[16] e gli standard di laboratorio 2013 dell'ACMG per il sequenziamento di nuova generazione[17]. Il campione di controllo positivo deve generare il genotipo previsto. Se il controllo positivo genera un genotipo diverso da quello previsto significa che si è verificato un errore nel monitoraggio del campione oppure una registrazione errata dei primer di indicizzazione. Il saggio deve essere ripetuto completamente a cominciare dalla preparazione delle librerie.
2. **Controllo negativo (nessun templato/nessun DNA)**: l'uso di un controllo negativo (nessun templato/nessun DNA) è richiesto su ciascuna corsa per rilevare possibili incidenze di contaminazione. La percentuale di identificazioni per il controllo positivo deve essere di almeno il 10%. Se un controllo negativo genera una percentuale di identificazioni di > 10%, potrebbe quindi essersi verificata una contaminazione durante l'elaborazione del saggio. Il saggio viene considerato non riuscito e deve essere ripetuto completamente, a cominciare dalla preparazione delle librerie.
3. **Controllo wild type**: il campione di DNA di controllo è raccomandato su ciascuna corsa. Il campione di controllo wild type deve essere un campione ben caratterizzato che non contiene nessuna variante del gene CFTR. Il campione di controllo positivo deve generare il genotipo previsto. Se il controllo wild type genera un genotipo diverso da quello previsto significa che si è verificato un errore nel monitoraggio del campione oppure una registrazione errata dei primer di indicizzazione. Il saggio deve essere ripetuto completamente a cominciare dalla preparazione delle librerie.
4. Prima di iniziare a usare questo prodotto nel laboratorio dell'utente, le prestazioni del saggio devono essere verificate testando un numero di campioni positivi e negativi con caratteristiche delle prestazioni note.
5. Tutti i requisiti di controllo della qualità devono essere eseguiti in conformità alle regolamentazioni locali, statali e/o e ai requisiti di certificazione.

Caratteristiche prestazionali

Accuratezza

L'accuratezza del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina è stata stimata valutando 500 campioni che rappresentano una vasta gamma di varianti del gene CFTR da quattro fonti separate. La fonte principale dei dati di accuratezza è stato uno studio di accuratezza clinica condotto usando un pannello di 366 campioni. La maggior parte (n = 355) dei campioni consisteva di campioni clinici di gDNA archiviati, anonimizzati e isolati da sangue umano, i restanti 11 campioni sono stati ottenuti da campioni di linee cellulari disponibili in commercio.

I dati di questo studio sono stati integrati con i dati di accuratezza ottenuti da 68 campioni di linee cellulari nello studio di riproducibilità, 14 campioni clinici ottenuti dallo studio di valutazione analitica del metodo di estrazione e 52 campioni di plasmidi sintetici. I plasmidi sintetici sono stati progettati per includere il contesto genomico di varianti rare e contenuti ovunque da una a dieci varianti entro lo stesso costrutto. Sono stati linearizzati, diluiti a numero di copie equivalenti di DNA genomico e miscelati con campioni di DNA genomico umano di genotipo wild type a numero di copie equivalenti per imitare un campione eterozigote.

Per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, un totale di 5.206 posizioni sono state confrontate con i metodi di riferimento del sequenziamento bidirezionale Sanger e l'analisi mediante PCR. I risultati di genotipizzazione per i siti SNV e Indel piccoli, inclusa la regione PolyTG/PolyT, sono stati confrontati con l'analisi bidirezionale delle sequenze di Sanger.

Sono stati usati due saggi convalidati basati sulla PCR come metodo di riferimento per due ampie delezioni nel pannello. Ciascun saggio di duplex PCR ha utilizzato due gruppi di primer per discriminare tra genotipi wild type, eterozigote e omozigote. Uno dei gruppi di primer è stato progettato per affiancare i punti di rottura delle delezioni, mentre l'altro gruppo ha amplificato una regione interna alla delezione. I due prodotti sono stati rilevati mediante separazione in base alla dimensione su un gel di agarosio. I saggi PCR sono stati convalidati usando un pannello di 28 campioni in tutto (22 campioni per ciascuna delezione) che consiste di campioni di DNA genomico di linee cellulari e derivati dal sangue e plasmidi sintetici, che hanno incluso i genotipi WT, HET e HOM per ciascuna ampia delezione. È stato confermato che i saggi PCR presentano una specificità e una riproducibilità del 100% per tutti i campioni testati, mediante la valutazione dei prodotti della PCR su un gel di agarosio. L'accuratezza dei saggi PCR è stata confermata usando il sequenziamento Sanger ed è stata del 100% per tutti i campioni.

L'accuratezza è stata determinata per ogni genotipo attraverso tre misurazione statistiche. La concordanza positiva (PA) è stata calcolata per ciascun genotipo di variante dividendo il numero di campioni con identificazioni di varianti concordanti per il numero totale di campioni con detta variante come identificato dai metodi di riferimento. La concordanza negativa (NA) è stata calcolata su tutte le posizioni wild type (WT) dividendo il numero di posizioni WT concordanti per il numero di posizioni WT come definito dai metodi di riferimento. La concordanza complessiva (OA) è stata calcolata su tutte le posizioni riportate dividendo il numero di posizioni di WT e delle varianti concordanti per il numero di posizioni riportate come determinato dai metodi di riferimento.

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing aveva una PPA a livello di genotipo del 99,66%, incluse le varianti PolyTG/PolyT (100% escludendo le varianti PolyTG/PolyT). La concordanza negativa (NA) per tutte le posizioni WT era > 99,99% e la concordanza complessiva (OA) per tutte le posizioni riportate era > 99,99%.

Tabella 12 Accuratezza complessiva per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Identificazioni errate	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
117120141	c.-8G>C^	SNV	Esone1	25	3	0	0	0	100
117120145	c.-4G>C^	SNV	Esone1	3	2	0	0	0	100
M1V	c.1A>G	SNV	Esone1	0	0	1	0	0	100
CFTR dele2, 3	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	Del	Introne1	4	1	0	0	0	100
R31C	c.91C>T	SNV	Esone2	3	1	0	0	0	100
Q39X	c.115C>T	SNV	Esone2	0	0	1	0	0	100
E60X	c.178G>T	SNV	Esone3	6	1	0	0	0	100
P67L	c.200C>T	SNV	Esone3	1	0	1	0	0	100
R74W	c.220C>T	SNV	Esone3	0	2	0	0	0	100
R74Q	c.221G>A	SNV	Esone3	2	0	0	0	0	100
R75X	c.223C>T	SNV	Esone3	3	1	0	0	0	100
R75Q	c.224G>A	SNV	Esone3	20	1	0	0	0	100
G85E	c.254G>A	SNV	Esone3	6	2	0	0	0	100
394delTT	c.262_263 delTT	DIV	Esone3	3	1	0	0	0	100
405+1G>A	c.273+1G>A	SNV	Introne3	0	0	1	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Identificazioni errate	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
406-1G>A	c.274-1G>A	SNV	Esone4	4	0	0	0	0	100
E92K	c.274G>A	SNV	Esone4	0	0	1	0	0	100
E92X	c.274G>T	SNV	Esone4	0	1	1	0	0	100
Q98X	c.292C>T	SNV	Esone4	0	0	2	0	0	100
444delA	c.312delA	DIV	Esone4	0	2	0	0	0	100
457TAT>G	c.325_327 delTAT insG	DIV	Esone4	0	0	1	0	0	100
D110H	c.328G>C	SNV	Esone4	1	0	1	0	0	100
R117C	c.349C>T	SNV	Esone4	4	0	0	0	0	100
R117H	c.350G>A	SNV	Esone4	17	2	0	0	0	100
Y122X	c.366T>A	SNV	Esone4	0	1	0	0	0	100
F143LfsX10	c.425delT	DIV	Esone4	0	1	0	0	0	100
574delA	c.442delA	DIV	Esone4	0	0	2	0	0	100
Q151K	c.451C>A	SNV	Esone4	1	0	0	0	0	100
621+1G>T	c.489+1G>T	SNV	Introne4	7	5	0	0	0	100
621+3A>G	c.489+3A>G	SNV	Introne4	1	0	0	0	0	100
663delT	c.531delT	DIV	Esone5	1	0	1	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Identificazioni errate	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
G178R	c.532G>A	SNV	Esone5	1	1	0	0	0	100
711+1G>T	c.579+1G>T	SNV	Introne5	3	1	0	0	0	100
711+3A>G	c.579+3A>G	SNV	Introne5	0	0	1	0	0	100
711+5 G>A	c.579+5G>A	SNV	Introne5	0	0	1	0	0	100
712-1 G>T	c.580-1G>T	SNV	Esone6	0	0	1	0	0	100
H199Y	c.595C>T	SNV	Esone6	0	0	1	0	0	100
P205S	c.613C>T	SNV	Esone6	1	0	1	0	0**	100
L206W	c.617T>G	SNV	Esone6	8	1	0	0	0	100
A209S	c.625G>T	SNV	Esone6	0	1	0	0	0	100
Q220X	c.658C>T	SNV	Esone6	0	0	1	0	0	100
L227R	c.680T>G	SNV	Esone6	0	0	1	0	0	100
852del22	c.720_741 delAGGG AGAATG ATGATG AAGTAC	DIV	Esone6	0	0	1	0	0	100
E279D	c.837A>T	SNV	Esone7	1	0	0	0	0	100
R297Q	c.890G>A	SNV	Esone8	2	0	0	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Identificazioni errate	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
1078delT	c.948delT	DIV	Esone8	1	1	0	0	0	100
L320V	c.958T>G	SNV	Esone8	1	0	0	0	0	100
G330X	c.988G>T	SNV	Esone8	1	1	0	0	0	100
R334W	c.1000C>T	SNV	Esone8	6	1	0	0	0	100
I336K	c.1007T>A	SNV	Esone8	0	1	0	0	0	100
T338I	c.1013C>T	SNV	Esone8	0	0	1	0	0	100
1154insTC	c.1022_10 23insTC	DIV	Esone8	0	1	0	0	0	100
S341P	c.1021T>C	SNV	Esone8	0	0	1	0	0	100
R347H	c.1040G>A	SNV	Esone8	6	1	1	0	0	100
R347P	c.1040G>C	SNV	Esone8	3	2	0	0	0	100
R352Q	c.1055G>A	SNV	Esone8	5	0	0	0	0	100
Q359K/ T360K	c.[1075C>A ;1079C>A]	SNV	Esone8	0	0	1	0	0	100
1213delT	c.1081delT	DIV	Esone8	0	0	1	0	0	100
1248+1G>A	c.1116+1G>A	SNV	Introne8	0	0	1	0	0	100
1259insA	c.1127_11 28insA	DIV	Esone9	0	0	2	0	0	100
W401X (c.1202G>A)	c.1202G>A	SNV	Esone9	0	0	1	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Identificazioni errate	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
W401X (c.1203G>A)	c.1203G>A	SNV	Esone9	0	0	1	0	0	100
1341+1G>A	c.1209+1G>A	SNV	Introne9	0	0	2	0	0	100
PolyTGPolyT	N.D.	PolyTG PolyT	Introne9	369	79	52	3	4[#]	98.60
1461ins4	c.1329_ 1330ins AGAT	DIV	Esone10	0	0	1	0	0	100
A455E	c.1364C>A	SNV	Esone10	4	2	0	0	0	100
1525-1G>A	c.1393-1G>A	SNV	Esone11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>A)	c.1397C>A	SNV	Esone11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>G)	c.1397C>G	SNV	Esone11	1	0	1	0	0	100
L467P	c.1400T>C	SNV	Esone11	0	0	1	0	0	100
V470M	c.1408G>A	SNV	Esone11	311	71	0	0	0	100
1548delG	c.1418delG	DIV	Esone11	1	0	1	0	0	100
P477S	c.1429C>T	SNV	Esone11	0	1	0	0	0	100
S485T	c.1454G>C	SNV	Esone11	1	0	0	0	0	100
S489X	c.1466C>A	SNV	Esone11	0	0	2	0	0	100
S492F	c.1475C>T	SNV	Esone11	0	0	1	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Identificazioni errate	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
Q493X	c.1477C>T	SNV	Esone11	4	2	0	0	0	100
I506V	c.1516A>G	SNV	Esone11	7	0	0	0	0	100
I507del	c.1519_1521 delATC	DIV	Esone11	4	2	0	0	0	100
F508del	c.1521_1523 delCTT	DIV	Esone11	84	29	0	0	0	100
I507V	c.1519A>G	SNV	Esone11	0	1	0	0	0	100
F508C	c.1523T>G	SNV	Esone11	1	1	0	0	0	100
1677delTA	c.1545_1546 delTA	DIV	Esone11	1	0	0	0	0	100
V520F	c.1558G>T	SNV	Esone11	2	0	0	0	0	100
Q525X	c.1573C>T	SNV	Esone11	0	0	1	0	0	100
E527E	c.1581A>G	SNV	Esone11	3	2	0	0	0	100
E528E	c.1584G>A	SNV	Esone11	6	2	0	0	0	100
1717-8G>A	c.1585-8G>A	SNV	Introne11	0	0	1	0	0	100
1717-1G>A	c.1585-1G>A	SNV	Esone12	4	1	0	0	0	100
G542X	c.1624G>T	SNV	Esone12	12	3	0	0	0	100
S549R (c.1645A>C)	c.1645A>C	SNV	Esone12	0	0	1	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Identificazioni errate	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
S549N	c.1646G>A	SNV	Esone12	2	2	1	0	0	100
S549R (c.1647T>G)	c.1647T>G	SNV	Esone12	3	1	0	0	0	100
G551D	c.1652G>A	SNV	Esone12	8	3	0	0	0	100
Q552X	c.1654C>T	SNV	Esone12	0	0	1	0	0	100
R553X	c.1657C>T	SNV	Esone12	8	2	0	0	0	100
I556V	c.1666A>G	SNV	Esone12	1	0	0	0	0	100
L558S	c.1673T>C	SNV	Esone12	0	0	1	0	0	100
A559T	c.1675G>A	SNV	Esone12	4	0	1	0	0	100
R560K	c.1679G>A	SNV	Esone12	0	0	1	0	0	100
R560T	c.1679G>C	SNV	Esone12	6	1	0	0	0	100
1811+1.6kb A>G	c.1679+1.6 kbA>G	SNV	Introne12	0	0	1	0	0	100
1812-1 G>A	c.1680-1G>A	SNV	Esone13	0	2	0	0	0	100
A561T	c.1681G>A	SNV	Esone13	1	0	0	0	0	100
V562I	c.1684G>A	SNV	Esone13	1	0	0	0	0	100
Y569D	c.1705T>G	SNV	Esone13	0	0	1	0	0	100
P574H	c.1721C>A	SNV	Esone13	0	1	0	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Identificazioni errate	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
G576A	c.1727G>C	SNV	Esone13	4	1	0	0	0	100
D579G	c.1736A>G	SNV	Esone13	0	0	1	0	0	100
E585X	c.1753G>T	SNV	Esone13	0	0	1	0	0	100
1898+1G>A	c.1766+1G>A	SNV	Introne13	2	1	0	0	0	100
1898+3A>G	c.1766+3A>G	SNV	Introne13	0	0	1	0	0	100
H609R	c.1826A>G	SNV	Esone14	0	1	0	0	0	100
D614G	c.1841A>G	SNV	Esone14	0	0	2	0	0	100
R668C	c.2002C>T	SNV	Esone14	5	2	0	0	0	100
R668H	c.2003G>A	SNV	Esone14	1	0	0	0	0	100
2143delT	c.2012delT	DIV	Esone14	2	1	0	0	0	100
K684TfsX4	c.2046_2047 delAA	DIV	Esone14	0	0	1	0	0	100
2183AA>G	c.2051_2052 delAAinsG	DIV	Esone14	3	1	0	0	0	100
2184delA	c.2052delA	DIV	Esone14	1	1	0	0	0	100
2184insA	c.2052_2053 insA	DIV	Esone14	3	0	1	0	0	100
S686Y	c.2057C>A	SNV	Esone14	0	1	0	0	0	100
R709X	c.2125C>T	SNV	Esone14	1	0	2	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Identificazioni errate	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
K710X	c.2128A>T	SNV	Esone14	3	0	0	0	0	100
E725K	c.2173G>A	SNV	Esone14	2	0	0	0	0	100
2307insA	c.2175_2176 insA	DIV	Esone14	3	0	2	0	0	100
L732X	c.2195T>G	SNV	Esone14	0	0	2	0	0	100
2347delG	c.2215delG	DIV	Esone14	0	0	2	0	0	100
P750L	c.2249C>T	SNV	Esone14	1	0	0	0	0	100
V754M	c.2260G>A	SNV	Esone14	2	1	0	0	0	100
R764X	c.2290C>T	SNV	Esone14	1	0	2	0	0	100
2585delT	c.2453delT	DIV	Esone14	0	0	2	0	0	100
E822X	c.2464G>T	SNV	Esone14	0	0	2	0	0	100
2622+1G>A	c.2490+1G>T	SNV	Introne14	0	0	2	0	0	100
E831X	c.2491G>T	SNV	Esone15	0	0	1	0	0	100
D836Y	c.2506G>T	SNV	Esone15	0	1	0	0	0	100
W846X	c.2537G>A	SNV	Esone15	0	1	0	0	0	100
R851X	c.2551C>T	SNV	Esone15	0	0	1	0	0	100
T854T	c.2562T>G	SNV	Esone15	212	44	0	0	0	100
2711delT	c.2583delT	DIV	Esone15	0	0	1	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Identificazioni errate	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
V868V	c.2604A>G	SNV	Esone15	2	0	0	0	0	100
c.2657+2_ 2657+3insA	c.2657+2_ 2657+3insA	DIV	Introne16	0	0	1	0	0	100
2789+5G>A	c.2657+5G>A	SNV	Introne16	9	1	0	0	0	100
Q890X	c.2668C>T	SNV	Esone17	1	0	0	0	0	100
A923A	c.2769C>T	SNV	Esone17	1	0	0	0	0	100
L927P	c.2780T>C	SNV	Esone17	0	0	1	0	0	100
S945L	c.2834C>T	SNV	Esone17	0	0	1	0	0	100
M952T	c.2855T>C	SNV	Esone17	1	0	0	0	0	100
3007delG	c.2875delG	DIV	Esone17	0	0	1	0	0	100
T966T	c.2898G>A	SNV	Esone17	5	0	0	0	0	100
G970R	c.2908G>C	SNV	Esone17	0	0	1	0	0	100
S977F	c.2930C>T	SNV	Esone18	0	0	1	0	0	100
3120G>A	c.2988G>A	SNV	Esone18	1	0	0	0	0	100
3120+1G>A	c.2988+1G>A	SNV	Introne18	7	1	0	0	0	100
3121-1G>A	c.2989-1G>A	SNV	Esone19	0	0	1	0	0	100
L997F	c.2991G>C	SNV	Esone19	2	1	0	0	0	100
I1027T	c.3080T>C	SNV	Esone19	1	2	0	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Identificazioni errate	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
3272-26A>G	c.3140-26A>G	SNV	Introne19	0	1	0	0	0	100
F1052V	c.3154T>G	SNV	Esone20	0	1	0	0	0	100
L1065P	c.3194T>C	SNV	Esone20	0	0	1	0	0	100
R1066C	c.3196C>T	SNV	Esone20	6	0	0	0	0	100
R1066H	c.3197G>A	SNV	Esone20	1	0	1	0	0	100
G1069R	c.3205G>A	SNV	Esone20	0	1	0	0	0	100
R1070W	c.3208C>T	SNV	Esone20	0	2	0	0	0	100
R1070Q	c.3209G>A	SNV	Esone20	0	1	0	0	0	100
L1077P	c.3230T>C	SNV	Esone20	0	0	1	0	0¥	100
W1089X	c.3266G>A	SNV	Esone20	4	0	0	0	0	100
Y1092X (C>A)	c.3276C>A	SNV	Esone20	3	1	0	0	0	100
Y1092X (C>G)	c.3276C>G	SNV	Esone20	0	0	1	0	0	100
T1095T	c.3285A>T	SNV	Esone20	7	0	0	0	0	100
M1101K	c.3302T>A	SNV	Esone20	2	2	0	0	0	100
E1104X	c.3310G>T	SNV	Esone20	0	0	1	0	0	100
c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	SNV	Introne20	0	1	0	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Identificazioni errate	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
D1152H	c.3454G>C	SNV	Esone21	10	1	0	0	0	100
V1153E	c.3458T>A	SNV	Esone21	1	0	0	0	0	100
R1158X	c.3472C>T	SNV	Esone22	7	1	0	0	0	100
R1162X	c.3484C>T	SNV	Esone22	5	1	0	0	0	100
R1162L	c.3485G>T	SNV	Esone22	0	2	0	0	0	100
3659delC	c.3528delC	DIV	Esone22	4	1	0	0	0	100
S1196X	c.3587C>G	SNV	Esone22	1	0	0	0	0	100
W1204X (c.3611G>A)	c.3611G>A	SNV	Esone22	0	0	1	0	0	100
W1204X (c.3612G>A)	c.3612G>A	SNV	Esone22	0	0	1	0	0	100
3791delC	c.3659delC	DIV	Esone22	2	0	0	0	0	100
I1234V	c.3700A>G	SNV	Esone22	1	0	1	0	0	100
S1235R	c.3705T>G	SNV	Esone22	9	1	0	0	0	100
3849+10 kbC>T	c.3717+ 12191C>T	SNV	Introne22	11	2	0	0	0	100
G1244E	c.3731G>A	SNV	Esone23	0	0	1	0	0	100
3876delA	c.3744delA	DIV	Esone23	6	1	0	0	0	100
S1251N	c.3752G>A	SNV	Esone23	1	0	1	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Identificazioni errate	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
3905insT	c.3773_3774 insT	DIV	Esone23	3	1	0	0	0	100
D1270N	c.3808G>A	SNV	Esone23	0	2	0	0	0	100
W1282X	c.3846G>A	SNV	Esone23	9	1	0	0	0	100
P1290P	c.3870A>G	SNV	Esone23	10	3	0	0	0	100
4005+1G>A	c.3873+1G>A	SNV	Introne23	0	0	1	0	0	100
4016insT	c.3884_3885 insT	DIV	Esone24	0	0	1	0	0	100
T1299T	c.3897A>G	SNV	Esone24	3	0	0	0	0	100
N1303K	c.3909C>G	SNV	Esone24	9	1	0	0	0	100
Q1313X	c.3937C>T	SNV	Esone24	0	0	1	0	0	100
G1349D	c.4046G>A	SNV	Esone25	0	1	0	0	0	100
4209TG TT>AA	c.4077_4080 delTGTT insAA	DIV	Esone25	0	0	1	0	0	100
CFTR dele22,23	c.3964-78_ 4242+577del	Del	Introne24	1	0	1	0	0	100
4382delA	c.4251delA	DIV	Esone27	0	0	1	0	0	100
Y1424Y	c.4272C>T	SNV	Esone27	6	2	0	0	0	100
Q1463Q	c.4389G>A	SNV	Esone27	150	32	0	0	0	100

Genotipo (Nome comune/Nome cDNA/Coordinata)	Nome cDNA	Tipo di variante	Regione gene CFTR (hg19)	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni non riuscite*	Identificazioni errate	Concordanza positiva
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici			
Totale di tutte le varianti (PPA)†				2072			3	4	99.66
Totale di tutti i WT (NA)				2600928			1	2§	> 99.99
Totale di tutti i WT e varianti (OA)				2603000			4	6	> 99.99

DIV è un acronimo per Deletion/Insertion Variant (variante delezione/inserzione).
* I campioni non sono stati analizzati nuovamente.
^ Il software non riporta il nome cDNA per questa coordinata genomica.
** Il report Sanger elencava la variante P205S come eterozigote per il campione clinico. Una revisione dei dati ottenuti dalla traccia Sanger indicava tuttavia che la variante era in effetti omozigote e riportata correttamente. MiSeqDx ha riportato la variante come omozigote.
# Uno dei risultati discordanti provenivano dallo studio di riproducibilità. Il risultato PolyTG/PolyT per il campione era concordante su tutti i 18 replicati, ma discordante con il sequenziamento bidirezionale Sanger.
¥ È stato determinato che il campione eterozigote sintetico originale era stato preparato impropriamente. Quando è stato analizzato successivamente dopo essere stato preparato usando lo stesso plasmide è stato rilevato.
† La concordanza positiva (PA) escludendo le identificazioni PolyTG/PolyT era del 100%.
§ Un campione eterozigote sintetico per l'esone 8 è stato riportato come eterozigote per la variante dele22, 23 del gene CFTR. Ulteriori indagini hanno rilevato che questo risultato proveniva da un livello di contaminazione ridotto. Inoltre, per il secondo campione, i primer Sanger non hanno rilevato completamente la variante Q1463Q a causa di Indel a monte e a valle del sito della variante.

Tabella 13 Accuratezza della variante PolyTG/PolyT per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Genotipo PolyTGPolyT	N. di campioni clinici	N. di campioni linee cellulari	N. di campioni sintetici	N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite*	% accuratezza
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50,00
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100

Genotipo PolyTGPolyT	N. di campioni clinici	N. di campioni linee cellulari	N. di campioni sintetici	N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite*	% accuratezza
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,91
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,31
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,33
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
totali	448			4	3	98,44

* I campioni non sono stati analizzati nuovamente.
^ Uno dei risultati discordanti proveniva dallo studio di riproducibilità. Il risultato PolyTG/PolyT per il campione era concordante su tutti i 18 replicati, ma discordante con il sequenziamento bidirezionale Sanger.

Riproducibilità

La riproducibilità del sistema per fibrosi cistica MiSeqDx è stata determinata attraverso uno studio condotto in cieco in 3 centri di sperimentazione con 2 operatori per ciascun centro. Due pannelli ben caratterizzati di 46 campioni ciascuno sono stati testati da ciascun operatore in ciascun centro per un totale di 276 risultati per operatore. Il panello era costituito da una miscela di DNA genomico proveniente da linee cellulari linfoblastoidi con mutazioni note nel gene *CFTR*, oltre che da sangue deleucocitato con aggiunta di linee cellulari linfoblastoidi con mutazioni note nel gene *CFTR*. I campioni di sangue servivano per consentire l'incorporazione delle fasi di estrazione necessarie per preparare il gDNA utilizzato come input primario per il flusso di lavoro del saggio.

La percentuale dei campioni "pass", vale a dire il numero di campioni che hanno superato la metrica QC al primo tentativo, è stato del 99,7%. Tutti i risultati sono basati su test iniziali.

La concordanza positiva (PA) a livello di genotipo per tutte le varianti inclusa la variante PolyTG/PolyT era del 99,22% ed escludendo la variante PolyTG/PolyT era del 99,60%. La concordanza negativa (NA) per tutti i WT era 99,70% e la concordanza complessiva (OA) per tutte le posizioni riportate era del 99,70%. La concordanza positiva (PA) per le varianti PolyTG/PolyT era del 97,83%.

Tabella 14 Riproducibilità del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing (escluse le varianti poliTG/poliT)

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
1	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
2	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	5	6	0	1	94,44
2	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1477C>T	Q493X	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
4	c.1408G>A	V470M	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.2052delA	2184delA	6	18	5	6	6	1	0	94,44
5	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.224G>A	R75Q	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.2562T>G	T854T	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.3472C>T	R1158X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.366T>A	Y122X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
5	c.625G>T	A209S	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
6	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.2051_ 2052delAAinsG	2183AA>G	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.223C>T	R75X	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.3846G>A	W1282X	6	18	6	5	6	0	1*	94,44

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
9	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.3140-26A>G	3272-26A>G	6	18	6	5	6	0	1*	94,44
10	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
11, 39	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2002C>T	R668C	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2988+1G>A	3120+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
12, 40	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
13	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.178G>T	E60X	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.3080T>C	I1027T	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
17, 41	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.3528delC	3659delC	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.-4G>C	117120145	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.350G>A	R117H	12	36	12	12	12	0	0	100
19	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.579+1G>T	711+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
20, 43	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.254G>A	G85E	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1364C>A	A455E	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
22	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1679G>C	R560T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.3276C>A	Y1092X(C>A)	6	18	6	6	6	0	0	100
24, 45	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.3909C>G	N1303K	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.4046G>A	G1349D	12	36	12	12	12	0	0	100
25	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
25	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
27, 46	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1652G>A	G551D	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1657C>T	R553X	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
28	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.91C>T	R31C	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
30	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1585-1G>A	1717-1G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.3484C>T	R1162X	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.1000C>T	R334W	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
34	c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	6	18	6	6	6	0	0	100
35	c.1523T>G	F508C	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.254G>A	G85E	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.3454G>C	D1152H	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1007T>A	I336K	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.3705T>G	S1235R	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.1727G>C	G576A	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2002C>T	R668C	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2057C>A	S686Y	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
47, 85	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
47, 85	c.2657+5G>A	2789+5G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
48, 86	c.54-5940_ 273+10250del21kb	CFTRdele2,3	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1408G>A	V470M	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	11	12	1	0	97,22
49, 87	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1766+1G>A	1898+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.220C>T	R74W	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.3808G>A	D1270N	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.2012delT	2143delT	12	36	12	12	12	0	0	100
52	c.3744delA	3876delA	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
53, 90	c.3773_3774insT	3905insT	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.262_263delTT	394delTT	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1519A>G	I507V	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.3080T>C	I1027T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
56	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.3154T>G	F1052V	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
57	c.3209G>A	R1070Q	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.2991G>C	L997F	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.3205G>A	G1069R	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.617T>G	L206W	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.2260G>A	V754M	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
62	c.988G>T	G330X	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1040G>A	R347H	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
65	c.948delT	1078delT	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.532G>A	G178R	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1647T>G	S549R (c.1647T>G)	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2506G>T	D836Y	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
69	c.2537G>A	W846X	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.274G>T	E92X	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
72	c.1022_1023insTC	1154insTC	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
73	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
73	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1826A>G	H609R	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	0	1	94,44
74	c.1429C>T	P477S	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
75	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1721C>A	P574H	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
76	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.425delT	F143LfsX10	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1364C>A	A455E	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
78	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.220C>T	R74W	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.3808G>A	D1270N	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1657C>T	R553X	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
81	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.-4G>C	11720145	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.350G>A	R117H	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Campione	Nome HGVS (o in mancanza, posizione)	Nome variante	Risultati totali		Concordanza identificazioni			Totale* (tutti i centri)		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione €	Identificazioni errate	
84	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
Totale di tutte le varianti (PA) - inclusi i dati PolyTG/PolyT nella Tabella 15**			2580	7740	2562	2553	2565	37	23	99,22
Totale di tutti i WT (NA)			2871132	8613396	2865930	2855526	2865932	26006	2	99,70
Totale di tutti i WT e varianti (OA)			2873712	8621136	2868492	2858079	2868497	26043	25	99,70

€ I campioni non sono stati sottoposti nuovamente a test.
^ Un replicato ciascuno dei campioni 5 e 75 ha registrato una percentuale di identificazione dello 0%. Ulteriori indagini indicavano che esisteva la possibilità che i campioni non fossero stati aggiunti alla piastra campioni prima della preparazione della libreria.
* Duranta la revisione, era probabile che i campioni 9 e 10 fossero stati scambiati dall'operatore prima della preparazione della libreria.
** Escludendo le varianti PolyTG/PolyT, la concordanza positiva (PA) era del 99,60%.

Tabella 15 Riproducibilità PolyTG/PolyT per il Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Pannello	Campione	Genotipo	N. di risultati		Concordanza identificazioni			Tutti i centri		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione	Identificazioni errate	
A	1	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	2	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	3	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	4	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
A	5	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44%
A	6	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%

Pannello	Campione	Genotipo	N. di risultati		Concordanza identificazioni			Tutti i centri		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione	Identificazioni errate	
A	7	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	8	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	9	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	10	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	11, 39	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	12, 40	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	13	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	14	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	15	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44%
A	16	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	17, 41	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	18, 42	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	19	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	20, 43	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	21, 44	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	22	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	23	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	24, 45	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%

Pannello	Campione	Genotipo	N. di risultati		Concordanza identificazioni			Tutti i centri		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione	Identificazioni errate	
A	25	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	26	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	27, 46	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	12	36	11	12	12	0	1	97,22%
A	28	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	29	(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	4	4	4	0	77,78%
A	30	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	31	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	32	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	33	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
A	34	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	35	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	36	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	37	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	38	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	47, 85	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	48, 86	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	11	11	12	2	0	94,44%
B	49, 87	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	50, 88	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%

Pannello	Campione	Genotipo	N. di risultati		Concordanza identificazioni			Tutti i centri		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione	Identificazioni errate	
B	51, 89	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	52	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	53, 90	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	54, 91	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	55, 92	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	56	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	57	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	58	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	59	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	60	(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	61	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	62	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	63	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	64	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	65	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	66	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	67	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	68	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%

Pannello	Campione	Genotipo	N. di risultati		Concordanza identificazioni			Tutti i centri		% di concordanza
			Per centro	Tutti i centri	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Nessuna identificazione	Identificazioni errate	
B	69	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	70	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	71	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	72	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	5	2	0	88,89%
B	73	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	74	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	75	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	5	6	1	0	94,44%
B	76	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	77	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	78	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	79	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	80	(TG)11(T)7/(TG)11(T)9	6	18	0	0	0	0	18*	0%
B	81	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	82	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	83	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	84	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
Totale varianti PolyTG/PolyT (PA)			552	1656	537	540	543	17	19	97,83%

* Tutti i 18 campioni concordavano fra loro ma discordavano dal sequenziamento bidirezionale Sanger.

Estrazione del DNA

Tre diversi metodi di estrazione usati comunemente e disponibili in commercio, estrazione mediante microsfere magnetiche, precipitazione alcolica e isolamento mediante colonna di gel di silice, sono stati valutati utilizzando sangue intero anticoagulato in K_2EDTA. Nel corso dello studio sono stati utilizzati complessivamente 14 campioni di sangue; due erano wild type mentre i rimanenti campioni erano portatori dei genotipi unici rappresentanti nove varianti diverse, inclusi varianti comuni e rare. Per i polimorfismi PolyTG/PolyT, sono stati inclusi campioni con (T)5-9 e (TG)10-12. I tre metodi di estrazione del DNA sono stati analizzati indipendentemente da due diversi operatori e ciascuno di loro ha eseguito tre corse per ciascun metodo di estrazione. Ciascuna estrazione è stata eseguita da ciascun operatore in giorni diversi. La concentrazione di DNA e il rapporto A260/A280 dei campioni di gDNA estratto sono stati determinati usando spettrofotometria. La dimensione complessiva dei campioni per ciascun metodo di estrazione esaminato nello studio è stato pari a 168 (14 campioni x 2 operatori/metodo di estrazione x 3 corse/operatore x 2 replicati/campioni di gDNA estratto).

Metodo di estrazione	Numero di campioni analizzati	Percentuale di identificazione	Accuratezza	Percentuale di campioni "first pass"*
Precipitazione alcolica	168	> 99,99%	> 99,99%	100%
Isolamento su colonna di gel di silice	168	> 99,99%	> 99,99%	100%
Estrazione con microsfere magnetiche	168	> 99,99%	> 99,99%	100%

* La percentuale di campioni che presentano una percentuale di identificazione di > 99% nella prima corsa.

Input di DNA

Il range di input di DNA per la piattaforma del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina è stato valutato eseguendo uno studio di diluizione in serie usando 14 campioni di DNA rappresentativi che contenevano 16 varianti uniche del gene della fibrosi cistica. Ciascun campione è stato analizzato in duplicati a 9 livelli di input di DNA che andavano da 1.250 ng a 1 ng (1.250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng e 1 ng). Per la determinazione dell'accuratezza, i genotipi dei campioni sono stati confrontati con i dati del sequenziamento bidirezionale Sanger, mentre le delezioni sono state confrontate con un saggio della PCR. 1.250 ng e 25 ng sono stati identificati come il legame superiore e inferiore per l'input di DNA rispettivamente in quanto hanno ottenuto una percentuale di campioni "first pass" del ≥95% senza identificazioni errate (100% di accuratezza e percentuale di identificazione).

Gli input di DNA di 1.250 ng, 250 ng e 100 ng sono stati ulteriormente analizzati con 4 campioni di DNA rappresentativi e 20 replicati per ciascun livello di input di DNA per ciascun campione (n=4x20=80 campioni), mentre il legame inferiore di 25 ng è stato analizzato con 14 campioni, 20 replicati per ciascun campione (n=14x20=280 campioni). L'accuratezza e la percentuale "first pass" dei campioni sono risultati pari al 100% a tutti i livelli di DNA input.

Sostanze interferenti

Per valutare l'impatto delle sostanze interferenti sul sistema per fibrosi cistica MiSeqDx Illumina, le prestazioni del saggio sono state valutate in presenza e in assenza di potenziali sostanze interferenti. Nello studio sono stati testati sedici campioni di sangue intero con genotipi CF unici. Quattro sostanze interferenti endogene (bilirubina, colesterolo, emoglobina e trigliceridi) sono state testate aggiungendole ai campioni di sangue prima dell'estrazione del DNA. I limiti di concentrazione di ciascuna sostanza sono riportati nella tabella seguente. Inoltre, per valutare l'interferenza risultante dalla raccolta del sangue (prelievo breve), EDTA è stato aggiunto ai campioni di sangue e per valutare l'interferenza risultante dalla preparazione dei campioni; il tampone di lavaggio finale ottenuto mediante un metodo di isolamento su colonna di gel di silice è stato aggiunto al DNA genomico purificato.

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing ha raggiunto una percentuale di identificazione del 100% per tutti i campioni analizzati e una riproducibilità del 100% nell'identificazione dei genotipi tra i campioni in presenza e in assenza delle sostanze interferenti. Non è stata osservata alcuna interferenza da qualsiasi interferente endogeno o esogeno.

Per valutare l'impatto dell'interferenza dei primer indice in multiplex, è stato eseguito uno studio sulla contaminazione incrociata usando due campioni, ciascuno campione con genotipi omozigoti univoci a quattro diverse posizioni genomiche e due rispettivi primer indice. Non è stato osservato alcun cambiamento nell'identificazione delle varianti con livelli di contaminazione < 40%. Il genotipo del campione è diventato eterozigote quando i livelli di contaminazione erano ≥ 40%.

Sostanza del test	Numero totale di replicati	Concentrazione testata nel sangue (limite superiore)	Concentrazione testata nel sangue (limite inferiore)	Percentuale di identificazione
Bilirubina	16	684 µmol/l	137 µmol/l	100%
Colesterolo	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100%
Emoglobina	16	2 g/l	0,4 g/l	100%
Trigliceride	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100%
EDTA	16	7,0 mg/ml	2,8 mg/ml	100%

Riferimenti

1 Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations—Correlation With Incidence Data and Application to Screening. Human Mutation 19:575 606.

2 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Gibson RL, et al. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. Genetics in Medicine 10(12):851–868.

3 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternen DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews. Seattle (WA): University of Washington; 2008. Disponibile alla pagina Web www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250. [Online] Aggiornato il 19 febbraio, 2008.

4 Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. Disponibile alla pagina Web www.uptodate.com. [Online] 7 dicembre 2012.

5 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et al. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. J Pediatr 153(2):S4–S14.

6 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.

7 Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Disponibile alla pagina Web www.genet.sickkids.on.ca/app. [Online] agosto 2013.

8 Committee on Genetics. (April 2011) The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis 486: 1–4.

9 Rohlfs EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L, et al. (2011) Cystic Fibrosis Carrier Testing in an Ethnically Diverse US Population. Clinical Chemistry; 57(6): 841–848.

10 Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et al. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. Nat Genet. 25 agosto [Epub prima della stampa].

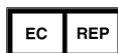
11 Castellani C, Cuppens H, Macek H Jr, Cassiman JJ, Kerem E, et al. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. J Cystic Fibrosis 7:179–196.

12 Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Disponibile alla pagina Web www.cftr2.org. [Online] agosto 2013.

13 The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) Project. Disponibile alla pagina Web www.nacfconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf. [Online] Presentato da Garry Cutting a nome del progetto CFTR2 al 25th Annual North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC) sponsorizzato da Cystic Fibrosis Foundation. 4 novembre 2011. Anaheim, CA, U.S.A..
14 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et al. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. Genetics in Medicine 6(5): 387–391.
15 Pratt VM, Caggana M, Bridges C, Buller AM, DiAntonio L, et al. (May 2009) Development of Genomic Reference Materials for Cystic Fibrosis Genetic Testing. Journal of Molecular Diagnostics 11(3): 186–193.
16 Amos J, Feldman GL, Grody WW, Monaghan K, Palomaki GE, et al. (2008 Edition, Revised 03/2011) American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories.
17 Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genetics in Medicine. Genetics in Medicine 15(9): 733–747.

Brevetti e marchi registrati

Informazioni di contatto

Illumina
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH L'Aia
Paesi Bassi

Etichettatura del prodotto

Fare riferimento alla chiave dei simboli spediti con ciascun kit per un riferimento completo ai simboli che possono apparire sulla confezione e sull'etichettatura del prodotto.